



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA - PGFAR
FÁRMACO MEDICAMENTOS E ANÁLISES CLÍNICAS

MIRELLE SIFRONI FARIAS

**AVALIAÇÃO DA INTERVENÇÃO NUTRICIONAL COM VITAMINAS E E C, E O
MINERAL ZINCO NO ESTRESSE OXIDATIVO DE PACIENTES COM HEPATITE C
EM TRATAMENTO COM INTERFERON ASSOCIADO À RIBAVIRINA**

Florianópolis - Santa Catarina – Brasil

2009

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA - PGFAR
FÁRMACO MEDICAMENTOS E ANÁLISES CLÍNICAS

Mirelle Sifroni Farias

**AVALIAÇÃO DA INTERVENÇÃO NUTRICIONAL COM *VITAMINAS E E C*, E O
MINERAL ZINCO NO ESTRESSE OXIDATIVO DE PACIENTES COM HEPATITE C
EM TRATAMENTO COM INTERFERON ASSOCIADO À RIBAVIRINA**

Dissertação apresentada como requisito
Parcial à Obtenção do Título de Mestre
em Farmácia – Fármaco Medicamento e
Análises Clínicas na Universidade Federal
de Santa Catarina – UFSC

Orientador: Prof. Dr. Danilo Wilhelm Filho

Florianópolis, SC, Brasil

Fevereiro, 2009

Catálogo na fonte pela Biblioteca Universitária da
Universidade Federal de Santa Catarina

- F224 Farias, Mirelle Sifroni
Avaliação da intervenção nutricional com vitaminas E e C, e o mineral zinco no estresse oxidativo de pacientes com hepatite C em tratamento com interferon associado à ribavirina [dissertação] / Mirelle Sifroni Farias ; orientador, Danilo Wilhelm Filho. -Florianópolis, SC, 2009.
132 f.: il., tabs., grafs.
- Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Farmácia.
- Inclui bibliografia
1. Farmácia. 2. Hepatite C. 3. Estresse Oxidativo. 4. Inibidores químicos. 5. Vitamina E. 6. Vitamina C. I. Wilhelm Filho, Danilo. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Farmácia. III. Título.

CDU 615.12

*Enquanto viveres, ninguém te poderá resistir;
Estarei contigo como estive com Moisés;
Não te deixarei nem abandonarei.
Sê firme e corajoso,
Porque tu hás te introduzir esse povo
Na posse da terra que jurei a seus pais dar-lhes.
Tem ânimo, pois, e sê corajoso
Para cuidadosamente observar toda a lei que Moisés,
Meu servo, te presceveu.
Não te afaste dela nem para direita nem para esquerda,
Para que sejas feliz em todas as tuas empresas.
Traze sempre na boca as palavras deste livro da lei,
Medita-o dia e noite,
Cuidando de fazer tudo o que nele está escrito.
Assim prosperarás em teus caminhos e serás bem sucedido.
Isto é uma ordem:
Sê firme e corajoso.
Não te atemorizes,
Não tenhas medo,
Porque o Senhor está contigo em qualquer parte para onde fores.
(Josué 1.5-9.)*

DEDICATÓRIA

*Ao meu companheiro, Alexandre, por todo apoio e compreensão.
Aos meus pais e irmãos, pelo amor incondicional e razão de toda a minha vida.*

AGRADECIMENTOS

A cada um dos pacientes que integra a presente casuística, por terem sido sempre colaborativos, não se importando se para eles o resultado foi ou não favorável. Acredito que conseguiram seu intento, pois mais que objetos de estudo, são também a razão maior deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Danilo Wilhelm Filho, meu orientador neste trabalho, pelos ensinamentos e paciência ao longo do meu período de mestrado e por ter me permitido crescer profissionalmente.

Aos meus avós, Maria (em memória) e Santilino (em memória); Nereu e Talita por terem me ajudado durante toda minha formação, pela confiança e por terem-me ensinado a ser justa e generosa.

À minha amada afilhada, Maria Laura, por ter me proporcionado momentos de alegrias e ter esperança que o mundo pode ser muito melhor.

A toda minha família: Tia Nice, minha segunda mãe, meus primos Tiane e Tiago, que sempre estiveram do meu lado, nos bons e maus momentos.

Ao José Alberto Wolf, por tantas indas e vindas de carro e pela paciência durante todo este período.

Agradeço a colaboração dos médicos, enfermeiros, técnicos do Pólo Nereu Ramos, do Hospital Universitário - UFSC e da Policlínica II- Centro de Florianópolis.

Ao “gerente” do Laboratório de Ecofisiologia Respiratória e Bioquímica, Eduardo Benedetti, que me auxiliou muito nas análises realizadas, além de ter acreditado e confiado em mim.

Às minhas amigas e irmãs de coração, Patrícia Budni e Carine Muniz Ribeiro, pessoas que introduziram o estresse oxidativo na minha vida e que participaram de muitas “brincas”, confusões, lágrimas e alegrias durante todo o período de mestrado.

Agradeço à Carla Ioschim, do laboratório de Física da UFRGS, pela colaboração e confiança depositada neste trabalho.

Ao Eduardo M. Dalmarco e à Prof. Dra. Tânia Frode, pela abertura das portas de seu laboratório e pela colaboração na avaliação da mieloperoxidase.

A todos do Laboratório de Ecofisiologia Respiratória e Laboratório de Bioquímica Experimental: Ana, Thaís, Débora, Patrícia e Viviane, que sempre me apoiaram durante as análises realizadas.

Ao Prof. Pio Colepicolo e a todos de seu Laboratório de Química – USP, pela importante colaboração na avaliação das vitaminas C e E, e que abriram portas importantes na minha formação.

A todos que, direta ou indiretamente, trabalharam conosco neste Projeto desde seu início.

RESUMO

As hepatites virais apresentam distribuição universal e magnitude variável de acordo com as regiões dos distintos países. A WHO estima que em torno de 3% da população mundial esteja infectada pelo vírus da hepatite C (VHC). Os mecanismos pelos quais o vírus da hepatite C causa dano celular ainda não são bem compreendidos, incluindo dano hepático imunológico, dano diretamente citotóxico mediado por diferentes produtos virais, bem como estresse oxidativo, têm sido sugeridos na patogênese da hepatite C crônica. O objetivo deste trabalho foi avaliar o *status* antioxidante no sangue de pacientes com hepatite C sem tratamento (Grupo II) e em tratamento com interferon peguilado associado à ribavirina (Grupo III) comparados a indivíduos saudáveis (Grupo I), antes e após suplementação antioxidante durante 6 meses (vitaminas E 800 mg/dia e C 500 mg/dia, e o mineral Zn 40 mg/dia). Foram examinadas as atividades das enzimas antioxidantes catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD), glutathiona peroxidase (GPx), glutathiona redutase (GR) e glutathiona S-transferase (GST), e as defesas antioxidantes não-enzimáticas, como os conteúdos de glutathiona reduzida (GSH), vitamina E e o mineral Zn. Foram dosados também os marcadores de dano, como a lipoperoxidação (níveis de TBARS), proteína carbonilada (PC), atividades da gama-glutamilttransferase (GGT), da alanina aminotransferase (ALT), da aspartato aminotransferase (AST) e da fosfatase alcalina (ALP). Foram avaliadas ainda a atividade da mieloperoxidase (MPO) e a concentração de ferro (Fe) eritrocitário. Os resultados das análises dos biomarcadores enzimáticos de estresse oxidativo mostraram muitas alterações entre os três grupos avaliados. Nas determinações iniciais, observou-se aumento da atividade de algumas enzimas (CAT, SOD, MPO, ALT) e depleção da concentração de GSH e vitamina E em pacientes com hepatite C sem tratamento (Grupo II). Foram observados aumentos na atividade enzimática da CAT, GST e GR, na concentração de PC, bem como depleção dos conteúdos de GSH em pacientes com hepatite C em tratamento com interferon peguilado associado à ribavirina (Grupo III), tanto quando comparados ao controle negativo (banco de sangue-Grupo I), como quando comparados ao grupo II, sugerindo ação pró-oxidante do interferon e/ou da ribavirina. Após a suplementação antioxidante, observou-se diminuição das atividades enzimáticas, da CAT, GST e GR e vitamina E, além dos níveis de zinco e ferro em pacientes do grupo II. Por outro lado, a suplementação antioxidante no grupo III permitiu melhorar o poder redutor destes pacientes, aumentar os níveis de GSH, provavelmente a expensas da vitamina E, a qual apresentou níveis diminuídos, assim como os níveis de PC, ferro e zinco. Em suma, pacientes com VHC sem tratamento são passíveis de dano oxidativo enquanto que pacientes tratados com interferon e/ou ribavirina aparentemente apresentaram dano oxidativos aumentados e observou-se que suplementação antioxidante melhorou esta condição.

Palavras chaves: hepatite C crônica, estresse oxidativo, defesas antioxidantes, suplementação antioxidante, vitamina E, vitamina C, Zn.

Evaluation of nutritional intervention with vitamins E and C, and mineral Zinc in oxidative stress of hepatitis C patients treated with interferon associated ribavirin

ABSTRACT

Viral hepatitis has a universal distribution and its magnitude varies according to regions of different countries. The WHO estimates that around 3% of the world population is infected by hepatitis C virus (HCV). The mechanisms by which HCV causes cellular damage are not yet well understood, which include immune liver damage, direct cytotoxic damage mediated by different viral products and oxidative stress, and all of them have been suggested in its pathogenesis. The objective of the present study was to evaluate blood antioxidant *status* of HCV patients without treatment (Group II) and treated with pegylated interferon associated with ribavirin (Group III) compared to healthy subjects (Group I) before and after antioxidant supplementation for 6 months (800mg/day of vitamins E and C 500mg/dia, 40mg/day of Zn). The activities of antioxidant enzymes catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx), glutathione reductase (GR) and glutathione S-transferase (GST), and non-enzymatic antioxidant defenses, such as the contents of reduced glutathione (GSH), vitamin E and zinc were analyzed. Biomarkers of damage such as lipoperoxidation (TBARS levels), protein carbonyl (PC), activities of gamma glutamyltransferase (GGT), alanine amnotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), phosphatase alkaline (ALP), myeloperoxidase (MPO), and the concentrations of erythrocytic iron (Fe) were also determined. The results showed several changes among the three groups. Initial determinations (before supplementation) showed increased activities of CAT, SOD, MPO and ALT, as well as depletion of GSH and vitamin E concentrations in HCV patients without treatment. Increased activities of CAT, GST and GR, increased PC concentration and depletion of GSH contents in HCV patients from group III were detected, both when compared to negative controls (Group I), as well as when compared to group II, suggesting prooxidant effect of interferon and/or ribavirin. After antioxidant supplementation a decrease in CAT, GR and GST activities as well as in vitamin E, iron and zinc contents in plasma were found. In the other hand, supplemented patients from group III improved reductive power through elevated GSH level in blood, probably due to vitamin E consumption, which showed decreased levels, as well as iron and zinc levels. In short, untreated HCV patients are facing an oxidative challenge whereas patients treated with pegylated interferon and/or ribavirin apparently enhanced oxidative insult and the antioxidant supplementation seems to ameliorate such condition.

Key words: chronic hepatitis C, oxidative stress, antioxidant defenses, antioxidant supplementation, vitamin E, vitamin C, zinc.

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
01-História Natural da Hepatite C Adaptada de Rodrigues-Luna & Douglas (2004).....	21
02 - Algoritmo para confirmação diagnóstica da Hepatite C por Shiff <i>et al.</i> , 2000.....	26
03 – Estrutura química da ribavirina. Adaptado de Melo <i>et al.</i> , 2006.....	30
04 – a) Interferon Standard; b) Interferon Peguilado. Fonte: www.hammersmithresearch.com	30
05 - Efeitos colaterais do interferon e da ribavirina (Chutaputti, 2000)....	31
06 - Fluxograma de Tratamento da Hepatite C : INF-alfa, INF PEG e ribavirina (Portaria SAS/MS 34, 2007).....	33
07 - Caracterização das principais EROs formadas <i>in vivo</i> (Sies, 1985; Halliwell & Gutteridge, 1999).....	35
08 – Estrutura química do α -tocoferol. Fonte: wikipoly.files.wordpress.com	39
09 – Etapas da lipoperoxidação e ação antioxidante do α - tocoferol (Cerqueira <i>et al.</i> , 2007).....	40
10 – Estrutura química do ácido ascórbico. Fonte: www.furg.br	42
11 – Etapas da peroxidação lipídica (Batista <i>et al.</i> , 2009).....	47
12 - Hipóteses de mecanismos mediados pelo VHC na indução de EROs (Adaptada de Machida <i>et al.</i> , 2006).....	52
13 - Atividade da Superóxido dismutase (SOD) antes e após a administração de vitamina E, C e do mineral Zn.....	78
14 - Atividade da Catalase (CAT) antes e após a administração de vitamina E, C e do mineral Zn.....	79
15 - Atividade da Glutaciona peroxidase (GPx) antes e após a administração de vitamina E, C e do mineral Zn.....	79
16 - Atividade da Glutaciona redutase (GR) antes e após a administração de vitamina E, C e do mineral Zn.....	80
17 - Atividade da Glutaciona S-transferase (GST) antes e após a	81

administração de vitamina E, C e do mineral Zn.....	
18 - Concentração da Glutathione reduzida (GSH) antes e após a administração de vitamina E, C e do mineral Zn.....	81
19 - Concentração de vitamina E antes e após a administração de vitamina E, C e do mineral Zn.....	82
20 - Concentração de vitamina Zn antes e após a administração de vitamina E, C e do mineral Zn.....	83
21 - Concentração de vitamina Fe antes e após a administração de vitamina E, C e do mineral Zn.....	83
22 - Concentração de substâncias que reagem ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) antes e após a administração de vitamina E e do mineral Zn	84
23- Concentração de proteína carbonilada antes e após a administração de vitamina E, C e do mineral Zn.....	85
24- Atividade da aspartato aminotransferase (AST) antes e após a administração de vitamina E, C e do mineral Zn.....	85
25- Atividade da alanina aminotransferase (ALT) antes e após a administração de vitamina E, C e do mineral Zn.....	86
26- Atividade da fosfatase alcalina (ALP) antes e após a administração de vitamina E, C e do mineral Zn.....	86
27- Atividade da aspartato Gama-glutamilttransferase (GGT) antes e após a administração de vitamina E, C e do mineral Zn.....	87
28 - Atividade da Mieloperoxidase (MPO) antes e após a administração de vitamina E, C e do mineral Zn.....	88
29 – Quadro sinóptico dos resultados obtidos no estudo.....	103

LISTA DE TABELAS

Tabela	Página
01 - Características demográficas e clínicas dos grupos controles (negativo – GI e positivo – GII) e grupo experimental –GIII.....	59
02 – Características clínicas da hepatite C no grupo controle positivo – GII e grupo experimental-GIII.....	60
03 – Comparação entre os grupos controle positivo-GII e grupo experimental-GIII em relação ao consumo alimentar e as RDA-DRI's (NAS, 2001).....	77

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ALP	Fosfatase Alcalina
ALT	Alanina Aminotransferase
AST	Aspartato Aminotransferase
Beta-HCG	Gonadotrofina coriônica humana
Ca ⁺⁺	Cálcio
CAT	Catalase
Cu ⁺⁺	Cobre
DSB	Double strand break
EROs	Espécies reativas de oxigênio
Fe ⁺⁺	Ferro
GCL	Glutamato cisteína ligase
GGT	γ -glutamilttransferase
GR	Glutathiona redutase
GPx	Glutathiona peroxidase
GSH	Glutathiona reduzida
GSSG	Glutathiona oxidada
GST	Glutathiona S-transferase
GT	Glutathiona total
HCC	Carcinoma hepatocelular
HIV	Vírus da Imundeficiência Adquirida
HNANB	Hepatite não A não B
HPLC	Cromatografia líquida de alta pressão
HO [•]	Radical hidroxil
H ₂ O	Água
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
HCIO ⁻	Ácido hipocloroso
HVR1	Região hipervariável da proteína E2
IMC	Índice de Massa Corporal
INF	Interferon
INF PEG	Interferon peguilado
MDA	Malondialdeído

MPO	Mieloperoxidase
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NF- κ B	Fator nuclear kappa-B
NK	Célula Natural Killer
\bullet NO	Óxido nítrico
O ₂	Oxigênio molecular
O ₂ \bullet^-	Ânion superóxido
¹ O ₂	Oxigênio singlete
ONOO ⁻	Peroxinitrito
PC	Proteína Carbonilada
PCR	Reação em cadeia de polimerase
RO \bullet	Radical alcóxil
ROO \bullet	Radical peróxil
RDA	Recomendações diárias
SOD	Superóxido dismutase
SSB	Single strand break
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
TCR	Receptores de células T
TGF- β	Fator de crescimento transformador beta
Th1	Células T helper 1
Th2	Células T helper 2
TNF- α	Fator de necrose tumoral
TMB	Taxa de metabolismo basal
TSH	Hormônio estimulante da tireóide
UL	Ingestão tolerável
UVA	Radiação ultravioleta A
UVB	Radiação ultravioleta B
VHC	Vírus da hepatite C
Zn	Zinco

SUMÁRIO	
DEDICATÓRIA.....	V
AGRADECIMENTOS	VI
RESUMO.....	VIII
ABSTRACT	IX
LISTA DE FIGURAS	X
LISTA DE TABELAS	XII
LISTAS DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	XIII
INTRODUÇÃO	19
1.1 Hepatite C Crônica.....	19
1.1.1 Importância.....	19
1.1.2 O Vírus da Hepatite C.....	19
1.1.3 História natural da Hepatite C e sua gravidade na fase crônica.....	20
1.1.4 Manifestações clínicas da hepatite C crônica.....	21
1.1.5 Diagnóstico da hepatite C	22
1.1.5.1 Testes bioquímicos	23
1.1.5.2 Testes imunoenzimáticos.....	24
1.1.5.3 Testes de biologia molecular	24
1.1.6 Patogenia da hepatite C crônica	26
1.1.6.1 Imunopatogênese da infecção pelo VHC	26
1.1.7 Tratamento da hepatite C	28
1.2 Espécies Reativas de Oxigênio.....	34
1.3 Defesas Antioxidantes	36
1.3.1 Vitamina E.....	38
1.3.2 Vitamina C.....	41
1.3.3 Zinco.....	43
1.4 Estresse Oxidativo	45
1.4.1 Dano ao DNA	46
1.4.2 Peroxidação Lipídica.....	46

1.4.3 Dano às proteínas	48
1.5 Estresse Oxidativo em Patologias Humanas.....	49
1.5.1 Estresse Oxidativo na Hepatite C	50
2 OBJETIVO GERAL.....	54
2.1 Objetivo Específicos	54
2.2 Justificativa e Importância do Trabalho	55
3 MATERIAS E MÉTODOS	57
3.1 Seleção dos pacientes	57
3.1.1 Critérios de inclusão	57
3.1.2 Critérios de exclusão	58
3.1.3 Dados obtidos.....	59
3.1.4 Caracterizações da Amostra.....	59
3.1.5 Definições	60
3.1.5.1 Protocolo clínico para tratamento da hepatite C.....	61
3.1.6 Avaliação Nutricional.....	62
3.1.6.1 Antropometria.....	62
3.1.6.2 Avaliação do Consumo Alimentar	63
3.1.6.3 Determinação das necessidades nutricionais e terapia nutricional.....	63
3.1.7 Suplementação	64
3.1.8 Estratégia após seleção dos pacientes.....	64
3.2 Análise Estatística.....	65
3.3 Considerações Éticas	65
3.4 Protocolo Experimental	66
3.5 Equipamentos.....	66
3.6 Reagentes	67
3.7 Defesas Antioxidantes e Marcadores de Estresse Oxidativo.....	67
3.7.1 Defesas Antioxidantes Enzimáticas	67
3.7.1.1 Superóxido Dismutase (SOD)	67
3.7.1.2 Catalase (CAT).....	68
3.7.1.3 Glutaciona Peroxidase (GPx).....	68
3.7.1.4 Glutaciona Redutase (GR).....	69

3.7.1.5 Glutationa S- Transferase (GST)	69
3.7.2 Análise das Defesas Antioxidantes não Enzimáticas	70
3.7.2.1 Glutationa Reduzida (GSH).....	70
3.7.2.2 Vitamina E	70
3.7.2.3 Vitamina C.....	70
3.7.2.4 Zinco e Ferro.....	71
3.7.3 Determinação dos Marcadores de Dano	72
3.7.3.1 Lipoperoxidação tecidual - TBARS.....	72
3.7.3.2 Proteína Carbonilada (PC).....	72
3.7.3.3 Aspartato Aminotransferase (AST).....	73
3.7.3.4 Alanina Aminotransferase (ALT).....	74
3.7.3.5 Fosfatase Alcalina (ALP)	74
3.7.3.6 Gama-glutamilttransferase (GGT)	75
3.7.4 Determinação da Mieloperoxidase.....	76
4 RESULTADOS.....	77
4.1 Avaliação do Consumo Alimentar	77
4.2 Determinação das Defesas Antioxidantes Enzimáticas	78
4.2.1 Atividade da SOD.....	78
4.2.2 Atividade da CAT	78
4.2.3 Atividade da GPx	79
4.2.4 Atividade da GR	80
4.2.5 Atividade da GST	80
4.3 Determinação das Defesas Antioxidantes Não Enzimáticas	81
4.3.1 Glutationa Reduzida (GSH).....	81
4.3.2 Vitamina E	82
4.3.3 Vitamina C.....	82
4.3.4 Zinco.....	82
4.3.5. Ferro	83
4.4 Determinação dos Marcadores de Dano.....	84
4.4.1 TBARS (Lipoperoxidação Tecidual).....	84
4.4.2 PC (Proteína Carbonilada).....	84

4.4.3 AST	85
4.4.4 ALT	85
4.4.5 ALP	86
4.4.6 GGT	87
4.5 MPO	87
5 DISCUSSÃO	89
6 CONCLUSÕES	104
7 PERSPECTIVAS	106
8 APÊNDICES	107
8.1 Apêndice I - Anamnese Nutricional, Recordatório Alimentar de 24h e Questionário de Frequência Alimentar	107
8.2 Apêndice II - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	112
9 ANEXOS	115
9.1 Anexo I - Parecer do Comitê de Ética de Pesquisa com Seres Humanos	115
10 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	118

1 INTRODUÇÃO

1.1 Hepatite C Crônica

1.1.1 Importância

A identificação do vírus da hepatite C por Choo e colaboradores (1989), ocorreu empregando-se técnicas de biologia molecular. No entanto, o vírus da hepatite C foi descrito primeiramente como hepatite não A não B (HNANB) em meados da década de 70, para designar as hepatites de provável etiologia viral, que não eram causadas pelos vírus das hepatites A ou B, e permaneciam sem diagnóstico etiológico definido (PRINCE *et al.*, 1974).

Nesta última década, entretanto, houve avanços significativos no entendimento de sua epidemiologia, modos de transmissão, patogênese, diagnóstica e terapêutica. Estima-se que 3% da população mundial seja infectada, sendo relevante o número de pessoas que desconhece o fato de albergar o vírus (WHO, 2007). Dados da WHO (2007) estimam que 2,5% a 4,9% da população brasileira esteja infectada pelo VHC, o que significa 3,9 a 7,6 milhões de pessoas com risco de desenvolver cirrose ou hepatocarcinoma. Apontou-se também que, no Brasil, 20% a 58% dos pacientes com hepatopatia crônica apresentam anticorpos contra VHC (anti-VHC).

As altas porcentagens de cronicidade da doença, seu potencial evolutivo para cirrose e hepatocarcinoma, assim como o fato de ser a mais freqüente etiologia diagnosticada em casos de transplante hepático, fazem com que constitua grave problema de saúde pública.

1.1.2 O vírus da hepatite C

A hepatite C é a inflamação causada pela infecção do vírus VHC, que pertence ao gênero *Hepacivirus* da família Flaviviridae, sendo seu genoma constituído por uma fita simples de RNA, positivamente orientado, com 9,6 kD, organizados em uma fase de leitura aberta (*open read frame – ORF*) (BRASS *et al.*, 2007; WARIS & SIDDIQUI, 2005). Possui forma esférica, com 30-60 nm de diâmetro e constituído por aproximadamente 9600 nucleotídeos, com uma única região de

leitura que produz uma proteína com cerca de 3000 aminoácidos (COCQUEREL *et al.*, 2006). Essa proteína é, após, partida por proteases virais e do hospedeiro em pelo menos 10 proteínas estruturais e não estruturais, que compõem o envoltório e o nucleocapsídeo viral (*core*) (proteínas estruturais: *core*, E1 e E2/p7), localizadas na extremidade carboxila; assim como possuem ações helicásica, proteásica e RNA polimerásica (proteínas não estruturais: NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A e NS5B), localizadas na extremidade amino da poliproteína (DUBUISSON, 2007; COCQUEREL *et al.*, 2006; OTSUKA *et al.*, 2000). Na extremidade carboxila do genoma (extremidade 5') existe uma região não codificada de 329 a 341 nucleotídeos, região mais conservada do genoma viral, tendo sido relacionada ser essencial na replicação viral e translocação de proteínas virais (WARIS & SIDDIQUI, 2005).

Análises da seqüência nucleotídica do VHC mostraram que a variação na seqüência do RNA pode ser até de 35%, que, com base nestas variações as estirpes do VHC são divididas em grupos designados genótipos, identificados até atualmente 6 genótipos, sendo no Brasil os mais freqüentes os genótipos 1, 2 e 3 (AUGUSTO & LOBATO, 2004; PORTARIA SAS/MS n. 863, 2002).

As principais vias de transmissão do VHC são por transfusão de sangue e derivados, uso de drogas injetáveis, transplante de órgãos ou tecidos, através de material (agulhas, seringas, utensílios de manicure, “piercings” e tatuagem) contaminado, transmissão vertical e contato sexual sem preservativos, sendo esta última pouco freqüente (WHO, 2000).

1.1.3 História natural da hepatite C e sua gravidade na fase crônica

A hepatite C é uma doença que evolui lentamente, com uma história natural da doença dividida em duas fases distintas (AUGUSTO & LOBATO, 2004):

- Aguda - com período de incubação variando de 2 semanas a 6 meses e os pacientes, na maior parte, não apresentam sintomas clínicos ou acompanham-se de sintomas ligeiros, muitas vezes inespecíficos (astenia, anorexia, mal estar ou dor abdominal). Em 20% a 30% dos casos pode haver icterícia, mal estar e náusea.
- Crônica – a progressão para a fase crônica depende de alguns fatores como duração prolongada e idade avançada na época da infecção, alto consumo de álcool, infecção pelo genótipo tipo 1 ou co-infecção com hepatite B ou HIV.

As principais complicações potenciais da infecção crônica pelo vírus da hepatite C, a longo prazo, são cirrose, insuficiência hepática terminal e carcinoma hepatocelular (BRASS *et al.*, 2007).

A história natural precisa da hepatite C é difícil de avaliar, pela falta de dados prospectivos, dificuldade de definir a data de transmissão e associações com outros fatores que alteram o curso da doença, como co-infecções e uso de álcool. Entretanto, como mostra a figura abaixo (Figura 01), da infecção aguda 15% evoluem para cura e 85% para cronicidade da doença, sendo que destes 60 a 70% permanecem estáveis, e 30 a 40% evoluem de forma progressiva para cirrose (1-7% ao ano) e hepatocarcinoma (1-4%) (RODRIGUES-LUNA & DOUGLAS, 2004).

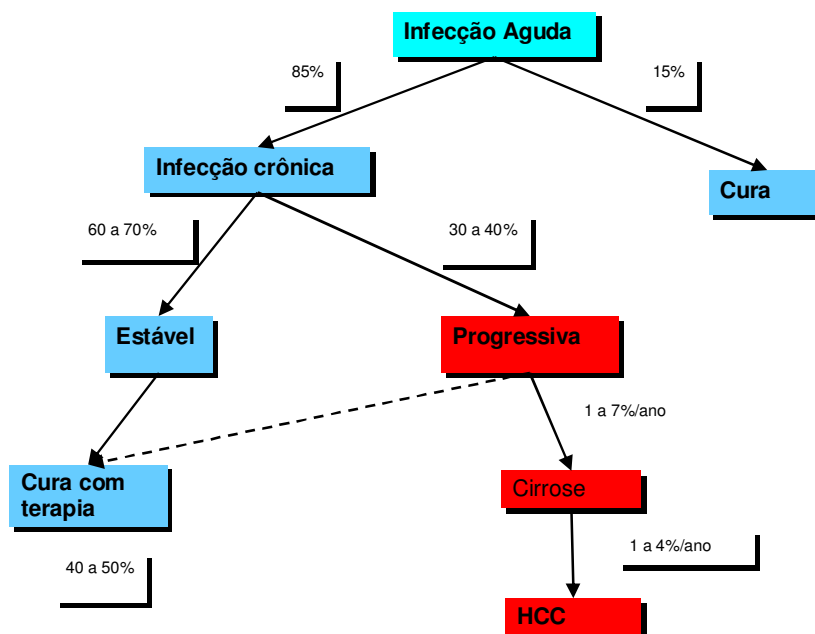


Figura 01 – História Natural da Hepatite C adaptada de Rodrigues-Luna & Douglas (2004).

O principal fator que confere grande importância à hepatite C é a sua alta cronicidade e a baixa efetividade do tratamento (40-50% dos pacientes com hepatopatia crônica) (STRAUSS, 2001).

1.1.4 Manifestações clínicas da hepatite C crônica

Os mecanismos pelos quais o vírus da hepatite C causa dano celular ainda não são bem compreendidos, porém incluem dano hepático imunológico, dano

diretamente citotóxico mediado por diferentes produtos virais, e o estresse oxidativo, tem sido sugerido na patogênese da hepatite C crônica (LEVENT *et al.*, 2006).

O vírus da hepatite C induz múltiplas respostas imunes e muitas linhas de estudo sugerem que linfócitos antivirais e células NK estão envolvidos na erradicação da infecção aguda e no controle da infecção crônica. A lesão histológica é caracterizada pela infiltração massiva de linfócitos no fígado, sendo que, em particular, a resposta imune nos pacientes cronicamente infectados é prejudicada em decorrência de o próprio VHC reduzir a citotoxicidade das células NK, além de estimular a apoptose aos linfócitos e células T (THORÉN *et al.*, 2004). Este processo imunológico leva à fibrose progressiva e alteração da arquitetura hepática, culminando com cirrose e suas conseqüências, como hipertensão portal e insuficiência hepática grave, podendo ainda, haver o desenvolvimento de carcinoma hepatocelular (GAYOTTO, 2002). Com base nos conhecimentos atuais a respeito da patogênese da infecção do VHC, é difícil compreender o mecanismo da carcinogênese. Os efeitos da necrose inflamatória e da morte celular levam à proliferação dos hepatócitos, com ciclo celular acelerado, e conseqüente acúmulo de mutações e instabilidade genômica (THORGEIRSSON & GRISHAM, 2002).

O VHC não é diretamente citopático e depende da resposta imune do hospedeiro, assim como da aquisição da infecção em idade avançada, ingestão alcoólica, co-infecção com HIV e outros vírus hepatotrópicos, além do sexo masculino, pois o mesmo não possui efeito protetor de estrógenos (AUGUSTO & LOBATO, 2004).

Dentre as manifestações sabidamente relacionadas com o VHC destaca-se, ainda, a crioglobulinemia, a glomerulonefrite, o linfoma, as manifestações cutâneas como *liquen planus*, vasculite cutânea, a porfiria cutânea tardia, entre outras (PYRSOPOULOS & REDDY, 2001).

1.1.5 Diagnóstico da hepatite C

O diagnóstico pela infecção do VHC baseia-se em dados clínicos, laboratoriais, sorológicos e histológicos. É realizado utilizando-se três categorias de provas laboratoriais: testes bioquímicos, imunoenzimáticos e de biologia molecular.

1.1.5.1 Testes bioquímicos

As enzimas celulares normalmente apresentam baixos teores séricos, mas os níveis elevam-se quando são liberadas a partir dos tecidos lesados. A utilidade diagnóstica da mensuração das enzimas plasmáticas reside no fato que as alterações em suas atividades fornecem indicadores sensíveis de lesão ou proliferação celular (Wilkinson, 1970).

As alterações séricas mais freqüentes na hepatite C referem-se às elevações dos níveis de aminotransferases: alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST), embora apresentem um padrão de atividade flutuante nesta patologia (HOOFNAGLE, 1997; HABER *et al.*, 1995). A ALT situa-se majoritariamente no citoplasma das células do parênquima do fígado; devido a isso, confere um caráter de bom marcador de doenças hepáticas, além de seu tempo de meia-vida não ser muito elevado ($\cong 47h$), minimizando testes falsos positivos no diagnóstico. Já a AST, não tem uma localização majoritária no fígado, mas sim por diferentes órgãos, como o coração e músculo esquelético, além de ter meia-vida mais curta que a ALT ($\cong 17h$) (GIANNINI *et al.*, 2003).

Além das aminotransferases, a gama glutamiltransferase (GGT) faz parte da avaliação bioquímica da hepatopatia crônica, e apresenta-se freqüentemente aumentada. A elevação da GGT pode estar relacionada à lesão do ducto biliar (GIANNINI *et al.*, 2001) e à progressão da doença hepática (IMBERT-BISMUT *et al.*, 2001). De modo semelhante, níveis aumentados de GGT estão associados à pior resposta ao tratamento com interferon (EBELING *et al.*, 2001).

A fosfatase alcalina (ALP), outra enzima que se apresenta em níveis elevados na hepatopatia crônica, pertence a um grupo de enzimas relativamente inespecíficas, pois está amplamente distribuída nos tecidos humanos, porém sua forma predominante no soro origina-se, principalmente, no fígado e esqueleto (GIANNINI, 2005).

Entretanto, os testes bioquímicos na hepatopatia crônica possuem baixa especificidade, pois existem dificuldades em relacionar a atividade enzimática aumentada com os tecidos lesados. Isto porque as enzimas não estão confinadas a tecidos ou órgãos específicos, e suas atividades podem refletir desordens envolvendo vários tecidos (GIANNINI, 2005).

1.1.5.2 Testes imunoenzimáticos

Os testes sorológicos baseiam-se na detecção de anticorpos dirigidos contra antígenos virais, estruturais e não-estruturais, no plasma do indivíduo infectado. Os anticorpos são detectados por vários métodos, sendo o mais utilizado a reação imunoenzimática (ELISA) (OKAMOTO *et al.*, 1990).

A detecção de anticorpos contra antígenos específicos do VHC é a maneira mais freqüentemente empregada para identificar a infecção, presente ou passada. Para isso, são utilizados testes de rastreamento, que apresentam alta sensibilidade, e testes suplementares, também denominados confirmatórios, com maior especificidade, sendo o mais utilizado o *Recombinat Immunoblot Assay* – RIBA (BRANDÃO *et al.*, 2001; ALTER *et al.*, 1991; JEROME & GRETCH, 2004).

Além do RIBA, existem outros testes suplementares por imunoblot para pesquisa do anti-VHC, de similar sensibilidade, como por exemplo, o teste Matrix VHC ou o Inno-Lia VHC III (COUROUCE *et al.*, 1998).

Em pacientes soropositivos nos testes sorológicos é recomendada a pesquisa do VHC-RNA utilizando-se a técnica da Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) (NAKATSUJI *et al.*, 1992; MEDEIROS-FILHO *et al.*, 2000).

1.1.5.3 Testes de biologia molecular

O padrão ouro para o diagnóstico de infecção pelo VHC é a determinação do RNA do VHC através do PCR. O método utiliza sondas de ácido nucléico (sondas genéticas ou *primers*, que são fragmentos de DNA ou RNA com estrutura complementar a uma seqüência do ácido nucléico a ser detectado. A PCR possibilita ampliar seqüências genéticas específicas, de tal modo que a única molécula de DNA ou RNA possa ser detectada na presença de milhões de outras (BRANDÃO *et al.*, 2001).

Os testes qualitativos informam a presença ou não do RNA viral (resultado positivo ou negativo), sendo as técnicas mais utilizadas RT-PCR (*reverse transcription-polymerase chain reaction*) e TMA (*transcription-mediated amplification*) (GRETCH *et al.*, 1993; PAWLOTSKY *et al.*, 1998).

O nível de RNA do VHC (ou carga viral) no soro ou plasma reflete as taxas de replicação viral e de eliminação do vírus pelo hospedeiro, detectado pelos testes

quantitativos, por biologia molecular, sendo utilizadas duas técnicas: uma utiliza a tecnologia da PCR e a outra, a do DNA ramificado (*branched DNA*) (GRETCH *et al.*, 1995).

Foram desenvolvidos também métodos por biologia molecular e sorotipagem para genotipagem do VHC, utilizando apenas as regiões mais conservadas do genoma, como a proteína do envoltório (E1), a proteína *core* e a proteína não estrutural NS5B. Os métodos que adotam a biologia molecular para genotipagem, utilizando porções do genoma, incluem a PCR *aninhada* (*nested PCR*), a técnica de RFLP (*restriction fragment length polymorphism*), a hibridização reversa e o seqüenciamento direto da região não-codificante 5' (OKAMOTO *et al.*, 1992; SIMMONDS *et al.*, 1993). Os métodos para determinação do genótipo que utilizam sorotipagem baseiam-se na detecção de anticorpos genótipo-específicos contra epítomos do VHC (MACHIDA *et al.*, 1992).

Além do diagnóstico sorológico e molecular, a biópsia hepática é o melhor método para avaliar a progressão da fibrose (FREEMAN *et al.*, 2001; MARCELIN *et al.*, 2002). A avaliação histológica é o método padrão para determinar a progressão da doença e o prognóstico é, ainda, um dos critérios de decisão terapêutica (NIH, 2002).

Portanto, os testes são utilizados não só para estabelecer o diagnóstico da infecção, mas também para o acompanhamento dos pacientes com hepatite C. A Figura 02 apresenta um algoritmo com os exames a serem solicitados em cada etapa, de acordo com a análise conjunta dos dados clínicos e laboratoriais (SHIFF *et al.*, 2000).

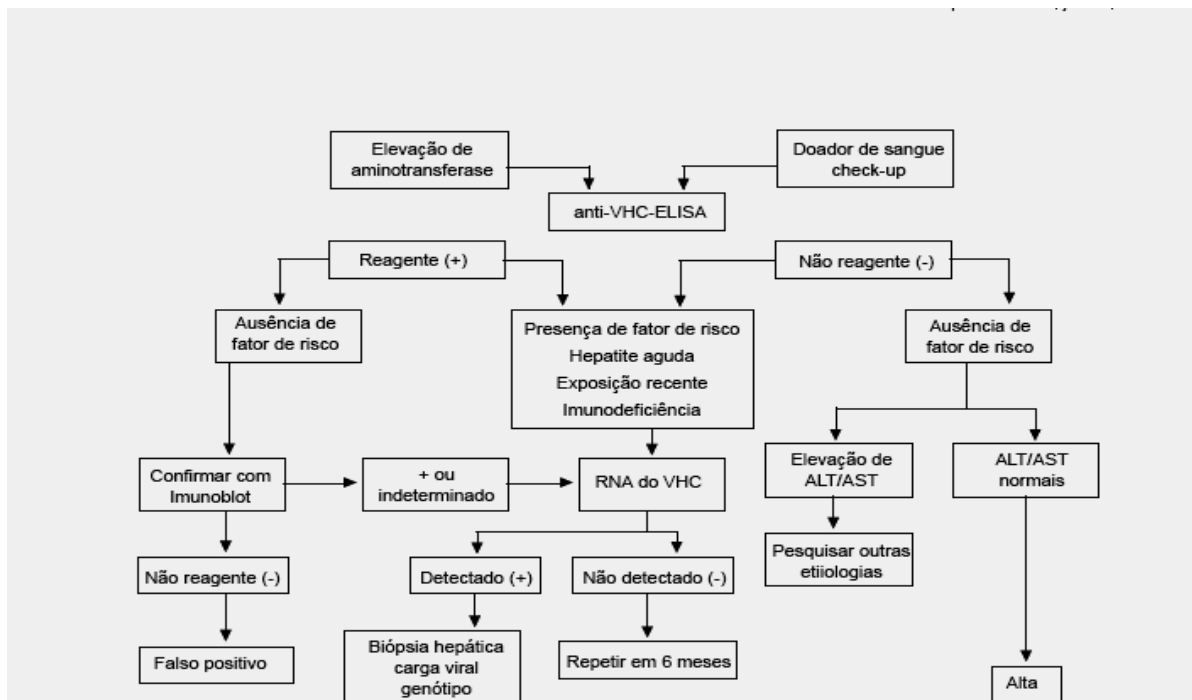


Figura 02 – Algoritmo para confirmação diagnóstica da Hepatite C por Shiff *et al.*, 2000.

1.1.6 Patogenia da hepatite C crônica

1.1.6.1 Imunopatogênese da infecção pelo VHC

Os mecanismos responsáveis pelo início e progressão das lesões hepáticas durante a infecção crônica são múltiplos, envolvendo fatores ligados ao próprio vírus e ao hospedeiro. O estudo de Gonzalez–Peralta e colaboradores (1994) mostraram que o dano hepático pode ser decorrente do efeito citopático direto do vírus e da resposta imune-mediada contra hepatócitos infectados pelo VHC, assim como Friedman e colaboradores (2003) mostraram que as citocinas podem estar envolvidas no desenvolvimento da lesão hepática.

A persistência e/ou clearance viral depende da interação vírus-hospedeiro, porém o mecanismo responsável não está bem elucidado. Entretanto, a presença de linfócitos T específicos contra o VHC no fígado, o aparecimento da viremia sob imunossupressão, características auto-imunes e a deterioração da doença na co-infecção com HIV, são características que sugerem que um mecanismo imuno-mediado seja fundamental na lesão hepática causada pelo vírus e também na eliminação do VHC (LAMONACA *et al.*, 1999; REHERMANN & CHIRASI, 2000).

Fatores virais como, tamanho, rota de entrada, composição genética do inóculo e taxa de replicação viral, determinam a cinética com que as células do hospedeiro serão infectadas, e a resposta imune que será desenvolvida.

O mecanismo de entrada do vírus na célula do hospedeiro ainda é desconhecido. Sabe-se que proteínas estruturais, do complexo de glicoproteínas E1 e E2, são componentes virais presentes na superfície das partículas de VHC (WAKITA *et al.*, 2005; DUBUISSON, 2007) e parecem estar envolvidas na ligação com receptores celulares do hospedeiro (COCQUEREL *et al.*, 2006), responsáveis pela internalização do vírus na célula.

Estudos demonstram alguns possíveis receptores ou co-receptores envolvidos na internalização do VHC: CD81, receptor scavenger classe B tipo I (SR-BI), lectinas L-SIGN e DC-SIGN, sendo que estas não são expressas nos hepatócitos e sim, principalmente, nas células endoteliais hepáticas e células dendríticas, respectivamente (KOPPEL *et al.*, 2005; COCQUEREL *et al.*, 2006; DUBUISSON, 2007). Além destes, devido à associação física do VHC com lipoproteínas de baixa ou de muito baixa densidade (LDL ou VLDL), o receptor de LDL tem sido também proposto como um candidato a receptor para o VHC (WÜNSCHMANN *et al.*, 2000). Entre estas moléculas, apenas CD81 e SR-BI tem demonstrado um envolvimento na internalização do VHC. No entanto, a co-expressão de CD81 e SR-BI em células não hepáticas não levam a entrada do VHC na célula do hospedeiro, indicando que outras moléculas expressas apenas nas células hepáticas, são necessárias para internalização do VHC (DUBUISSON, 2007).

A resposta imune inespecífica é constituída por complemento, interferon alfa e beta, macrófagos, neutrófilos, células naturais Killer e anticorpos naturais, os quais podem controlar a viremia, porém não conseguem erradicá-la (PETERS, 1998; REHERMANN & CHISARI, 2000).

O mecanismo pelo qual o VHC utiliza para evitar a resposta imune e permitir a persistência viral ainda não está bem definido, mas a resposta imune específica é iniciada por macrófagos e células dendríticas que apresentam as proteínas virais às células B, células T auxiliares e células T citotóxicas (REHERMANN & CHISARI, 2000).

A memória imunológica, a ativação das células T citotóxicas e os anticorpos neutralizantes são os responsáveis pelo clareamento viral e pela recorrência da

viremia, sendo que a distribuição dos linfócitos T intra-hepáticos entre fenótipos Th1 e Th2 parecem exercer um papel fundamental na inflamação hepática e na evolução final da infecção (BERTOLETTI *et al.*, 1997).

Além disso, parece haver na infecção aguda da hepatite C alguma correlação entre a resposta rápida e precoce de células T e possível clareamento viral. Portanto, o clareamento viral decorre do balanço entre a resposta imune do hospedeiro e a replicação viral, sendo a resposta imune responsável por ambos, pelo clareamento viral e pela lesão celular (PETERS, 1998; NELSON *et al.*, 2001).

O VHC pode causar infecção crônica apesar de uma resposta imune celular e humoral ativa, pois o vírus pode escapar da resposta imune, quando a cinética da infecção e a replicação viral não permitirem que os anticorpos promovam completa neutralização após a primo-infecção.

A persistência viral pode estar associada à distribuição de *quasispecies* mais complexas e à maior complexidade da região hipervariável da proteína E2 (HVR1) (FARCI *et al.*, 2000). Outra hipótese para persistência viral e conseqüente cronicidade da hepatite é que a resposta imune é qualitativa e/ou quantitativamente insuficiente para destruir as células infectadas (HOUGHTON, 2000). Além disso, há hipóteses que proteínas do VHC parecem reduzir a expressão de receptores de células T (TCR), impedindo resposta proliferativa ou citotóxica, podendo também promover anergia das células T (BERTOLETTI *et al.*, 1997).

O VHC pode também interferir ativamente na resposta imune, sugerindo que sequências de proteínas da região estrutural E2 e não estrutural NS5 do VHC poderia inibir a ativação da proteína-kinase pelo interferon (KORTH *et al.*, 2000).

Entretanto, não existe consenso sobre os fatores que podem influenciar a persistência viral e a progressão para hepatite crônica, sendo um processo multifatorial que depende de múltiplos aspectos na interação vírus-hospedeiro (REHERMANN & CHISARI, 2000; STRAUSS, 2001).

1.1.7 Tratamento da hepatite C

Desde o reconhecimento do vírus, em 1989, têm sido desenvolvidas terapias que permitem reduzir a morbidade e mortalidade associadas às infecções crônicas pelo VHC (AUGUSTO & LOBATO, 2004).

O tratamento da hepatite C tem como objetivo primário a supressão sustentada da replicação viral, compreendida como ausência de RNA viral por, no mínimo, seis meses após a suspensão da terapia (STRAUSS, 2001; PORTARIA SAS/MS n. 863, 2002; MARCELLIN *et al.*, 1997).

Os interferons pertencem à superfamília das citocinas, responsáveis por efeitos antivirais, antiproliferativos e imunomoduladores por excelência (ACRAS *et al.*, 2004). Existem três classes de interferons (INFs): alfa/beta/gama, que são imunológica, estrutural e antigenicamente diferentes entre si. O alfa é produzido por monócitos e células B frente a infecções virais e estímulos antigênicos. O beta é produzido por fibroblastos e é semelhante ao alfa. Já o gama, tem estrutura e loco genético diferente dos INFs alfa e beta e é formado pelas células T e NK, sendo seu efeito mais imunomodulador que antiviral (PETERS, 1989; ACRAS *et al.*, 2004).

Em 1997, um consenso americano estabeleceu o uso do interferon-alfa isolado para tratamento da hepatite C crônica (ACRAS *et al.*, 2004).

Durante os anos 80, o INF-alfa foi utilizado em monoterapia; no entanto, apenas 6 a 12% dos pacientes tratados por seis meses e 12 a 20% dos pacientes tratados por doze meses apresentaram resposta virulógica sustentada ao tratamento (DI BISCEGLIE & HOOFNAGLE, 2002). A baixa eficácia da monoterapia com INF-alfa levou à realização de ensaios clínicos, que tinham como objetivo avaliar o benefício da associação de INF-alfa com outros fármacos. Em 1998 foram publicados os primeiros resultados que mostravam uma melhora significativa da taxa de resposta sustentada quando se associava ao INF-alfa um análogo nucleosídico com ação antiviral, a ribavirina (Figura 03) (MANNIS, 2002; DAVIS *et al.*, 1998; POYNARD *et al.*, 1998; PORTARIA SAS/MS n. 863, 2002). Essa conduta de terapia combinada, foi posteriormente ratificada pelo Consenso Internacional de Paris realizado em 1999 (EASL, 1999). Esse esquema terapêutico apresentou 40% de resposta virulógica sustentada, atingindo 50% entre os doentes que tinham recidivado sob monoterapia (DAVIS *et al.*, 1998).

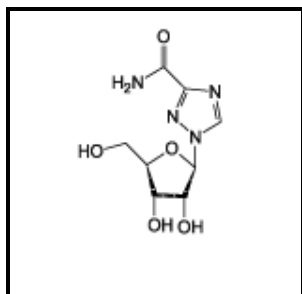


Figura 03 – Estrutura química da ribavirina. Adaptado de Melo *et al.*, 2006.

Recentemente, as formas standard de INF foram substituídas pelo INF pegulado (INF PEG) (Figura 04). A pegulação é uma técnica desenvolvida pela indústria, que consiste em unir uma molécula de polietilenoglicol à molécula de interferon-alfa, retardando sua eliminação urinária, com meia-vida longa; dessa forma, suas dosagens séricas permanecem elevadas por um maior tempo (PORTARIA SAS/MS n. 863, 2002; FRIED *et al.*, 2002).

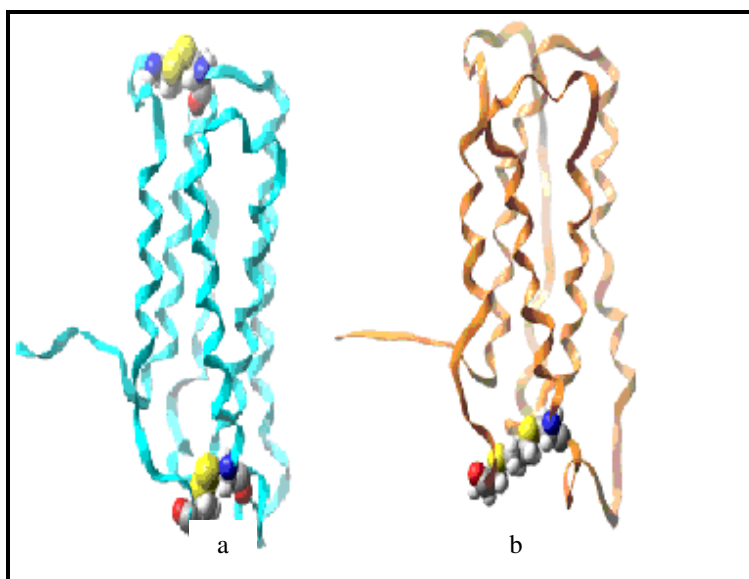


Figura 04 – a) Interferon Standard; b) Interferon Pegulado. Fonte: www.hammersmithresearch.com.

O uso do INF PEG em monoterapia acompanhou-se de uma resposta sustentada em 25-30% dos pacientes. Estes resultados, embora fossem melhores que os obtidos com o INF-alfa em monoterapia, não atingiam a resposta conseguida com a terapêutica combinada (INF-alfa + ribavirina) (SEREJO, 2003).

A associação do INF PEG à ribavirina permitiu aumentar a taxa de resposta virológica sustentada de 40 para 50-55% (SEREJO, 2003). Atualmente, esta

associação é considerada a terapia mais eficaz para pacientes com hepatite C crônica que não apresentam contra-indicações ao uso destes fármacos (CONSENSO HEPATITE C – PARIS, 2002; CONSENSO HEPATITE C – BRASIL, 2002).

Entretanto, a terapia para hepatite C pode apresentar efeitos colaterais precoces, ou seja, logo após a aplicação do INF (4-6 horas), ou tardios, dentre estes, temos os efeitos sistêmicos, os hematológicos, os infecciosos, os autoimunes e os psiquiátricos (CONTE, 2000). Na figura 05 são apresentados os principais efeitos colaterais do INF e da ribavirina.

<p><i>I – Interferon</i></p> <ul style="list-style-type: none"> . Sintomas gripais: febre, mal estar, mialgias, artralgias, cefaléia . Mielosupressão dose-dependente: neutropenia, plaquetopenia, anemia (leve) . Alterações gastrointestinais: náuseas, diarreia . Sintomas neuro-psiquiátricos: cansaço, irritabilidade, alterações de comportamento, labilidade emocional, depressão, tendência suicida, ataxia, parestesias e neuropatias (muito raros). . Alterações endócrinas e imunológicas: diabetes mellitus, hiper ou hipotireoidismo, hepatite auto-imune, artrite reumatóide, anemia hemolítica auto-imune, purpura trombocitopenica (raro). . Alterações dermatológicas: queda de cabelos e <i>rash</i> cutâneo, liquen plano e psoríase (raros). . Efeitos eventuais sobre outros órgãos/sistemas: <ul style="list-style-type: none"> Cardiovasculares: arritmias, isquemia, cardiomiopatias Renais: nefrite intersticial, síndrome nefrótica e insuficiência renal aguda Pulmonares: pneumonite, dispneias, febre, hipoxemia Oftalmológicos: alterações na retina: hemorragias ou isquemia Auditivos: diminuição temporária de audição <p><i>II – Ribavirina</i></p> <ul style="list-style-type: none"> . Anemia hemolítica dose dependente . Efeitos não específicos de leve intensidade: fadiga, cefaléia, insônia, vertigem, depressão, congestão nasal, faringite, tosse e prurido . Exacerbação de alterações cardiovasculares pela anemia . Abortos ou mal formação congênita em caso de gravidez

Figura 05 – Efeitos colaterais do interferon e da ribavirina (CHUTAPUTTI, 2000).

A indicação do tratamento depende de fatores variados como idade, estado geral de saúde, probabilidade de resposta terapêutica e contra-indicações ao uso do interferon e/ou ribavirina. No entanto, o aspecto que deve requerer maior atenção no momento da indicação é a própria doença hepática. A maioria dos consensos (europeu e brasileiro) revela que pacientes com hepatite crônica apresentando elevação de transaminases (ao menos 1,5 ou 2 vezes maior que o limite normal do teste) devam ser submetidos à biópsia hepática, e devam ser tratados os que

tiverem, na histologia, lesões necro-inflamatórias e/ou fibrose moderadas a acentuadas. Os pacientes que apresentam transaminases persistentemente normais costumam ter fígado normal ou com infiltrado inflamatório leve, não sendo indicado tratamento. A presença de cirrose compensada não contra-indica o tratamento, porém está associada à pior resposta terapêutica. Em casos de cirrose descompensada, o tratamento pode apresentar complicações e não tem benefícios comprovados, sendo, portanto, contra-indicado. A carga viral e genótipo não devem ser critérios usados para definir indicação de tratamento, e sim para programação de sua duração e previsão de resposta (PORTARIA SAS/MS n. 863, 2002). A figura 04 apresenta o fluxograma de tratamento da hepatite C, conforme o Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas – Hepatite Viral Crônica C (PORTARIA SAS/MS n. 34, 2007).

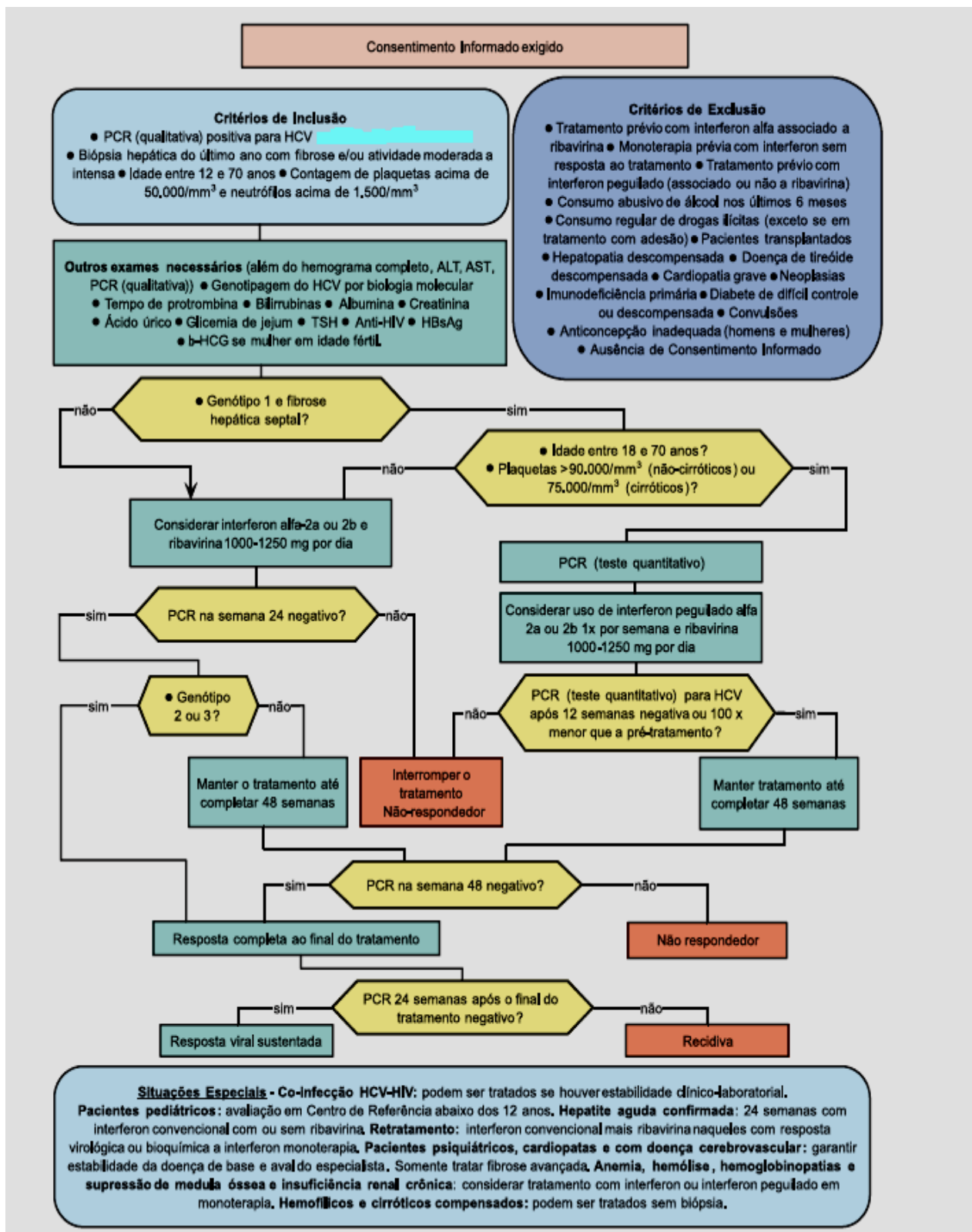


Figura 06 – Fluxograma de Tratamento da Hepatite C: INF-alfa, INF PEG e ribavirina (PORTARIA SAS/MS 34, 2007).

1.2 Espécies Reativas de Oxigênio

O oxigênio molecular (O_2) é considerado indispensável para a produção eficiente de energia em todos os animais, plantas, fungos e microrganismos aeróbios, sendo neles utilizado comoceptor final de elétrons, o que permite elevada produção de energia na respiração celular, em consequência de seu alto potencial termodinâmico (WILHELM FILHO *et al.*, 2000). Existe, porém, um paradoxo, pois o O_2 , assim como é indispensável para a vida, pode resultar em danos reversíveis ou até irreversíveis, pois o O_2 é um gás que pode tornar-se tóxico através de sua utilização, e os organismos aeróbios sobrevivem ao seu uso devido às várias defesas antioxidantes (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2006). Devido à sua configuração eletrônica, o O_2 pode sofrer reduções parciais e levar à formação de radicais livres (FRIDOVICH, 1996). Em torno de 98% do oxigênio consumido em organismos aeróbios é reduzido de forma tetravalente até H_2O (CHANCE *et al.*, 1979), através de reações enzimáticas na cadeia de transporte de elétrons mitocondrial. No entanto, cerca de 2% escapa desta redução completa e liga-se de forma monovalente, levando à formação de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs).

As espécies químicas na forma de radicais livres centradas no oxigênio são de grande interesse na área biológica, porque a partir delas podem ser geradas espécies reativas, envolvendo outros átomos. A evolução do conhecimento sobre os radicais livres de oxigênio no meio biológico foi gradativa, iniciando-se com a identificação de enzimas cujos substratos são radicais livres e progredindo para a identificação de vias metabólicas geradoras de tais espécies, a detecção de efeitos celulares e teciduais deletérios, quando os radicais livres alcançam concentrações elevadas no meio fisiológico, a associação do envolvimento de radicais livres com várias condições patológicas e, por último, a participação de espécies reativas em vias de sinalização celular (McCORD & FRIDOVICH, 1969; TURRENS & BOVERIS, 1980; SIES, 1985; HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2006).

Existem várias definições para o termo “radical livre”, e alguns autores adotam uma definição abrangente e definem radical livre como espécie que tem um ou mais elétrons desemparelhados, e que são capazes de existência independente (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2006). A terminologia espécies reativas de oxigênio (EROs) inclui as espécies radicalares e outras que, embora não possuam elétrons desemparelhados, são reativas em decorrência de sua instabilidade, como o

peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o oxigênio singleto ($^1\text{O}_2$) (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2006).

Pela sua configuração eletrônica, o oxigênio tende a receber um elétron de cada vez, formando compostos intermediários altamente reativos. O ânion radical superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$) é o primeiro intermediário da redução monovalente do oxigênio até água, enquanto a redução de mais um elétron, ou a ação enzimática da superóxido dismutase (SOD), produz H_2O_2 (peróxido de hidrogênio). Através de adição de um elétron ao H_2O_2 , ou catalizado pelo sistema $\text{Fe}^{+2}/\text{Fe}^{+3}$ ou $\text{Cu}^{+2}/\text{Cu}^{+3}$, caracterizando a Reação de Fenton, forma o HO^{\bullet} (radical hidroxil). Outra ERO importante é o $^1\text{O}_2$, uma espécie do oxigênio molecular excitada foticamente, igualmente importante promotora de danos em sistemas biológicos (PRYOR, 1986; HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2006). Existem outras EROs formadas em reações de propagação, como os radicais peroxil (ROO^{\bullet}) e alcóxil (RO^{\bullet}), além de espécies reativas derivadas do óxido nítrico ($^{\bullet}\text{NO}$), como o peroxinitrito (ONOO^-) (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2006). A caracterização das principais EROs formadas *in vivo* são apresentadas na figura 07.

Intermediário	Comentário	Meia-vida	Sítios de formação
Radical superóxido	Formado a partir da redução parcial do oxigênio molecular por 1 elétron.	Decomposição enzimática na velocidade aproximada de $5 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{sec}^{-1}$ em pH 7,0.	Reações de autooxidação envolvendo flavoproteínas e ciclos redox.
Peróxido de hidrogênio	Formado a partir da redução parcial do oxigênio molecular por 2 elétrons.	Decomposição enzimática.	Vias catalisadas por oxidases, e pela superóxido dismutase.
Radical hidroxil	Formado a partir da redução do oxigênio molecular, por 3 elétrons nas reações de Fenton e Haber-Weiss, catalisada por metais.	10^{-9} segundos	Locais adjacentes à formação de ânion superóxido/peróxido de hidrogênio na presença de metais, principalmente ferro; produto de reação do óxido nítrico com o radical superóxido.
Radical alcóxil	Radical orgânico centrado no oxigênio.	10^{-6} segundos	Intermediário na peroxidação de lipídios de membrana.
Radical peroxil	Formado a partir de hidroperóxidos orgânicos	7 segundos	Intermediário na peroxidação de lipídios de membrana.
Oxigênio molecular Simpleto. ($^1\Delta_g\text{O}_2$)	Primeiro estado excitado do Oxigênio Molecular com nível de energia de 22 kcal/mol. acima do estado fundamental ou oxigênio tripleto ($^3\text{O}_2$).	10^{-4} segundos	Sem sítios metabólicos definidos.

Figura 07 – Caracterização das principais EROs formadas *in vivo* (SIES, 1985; HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2006).

Quanto ao potencial de reatividade das EROs no meio biológico, o HO[•] é o mais reativo, apesar de concentrações intracelulares extremamente baixas ($\cong 10^{-18}$ M) e reduzidíssimo tempo de vida-média ($\cong 10^{-9}$ s) (CHANCE *et al.*, 1979). Isto faz com que ele reaja muito rapidamente com quase todos os tipos de moléculas, como açúcares, aminoácidos, proteínas, fosfolipídeos e bases de DNA (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2006), proporcionando as principais reações de iniciação e propagação envolvendo EROs (peroxidação lipídica, carbonilação de proteínas e dano ao DNA).

As EROs podem ser originadas tanto exógena quanto endogenamente. As fontes exógenas de EROs incluem principalmente luz ultravioleta, nos comprimentos de onda maiores que 280 nm – UVA e UVB, radiação ionizante e agentes químicos. Já as EROs formadas intracelularmente são originadas principalmente como consequência do próprio metabolismo celular, na cadeia de transporte de elétrons na mitocôndria, entre os complexos I e III, nas vias da xantina oxidase, da síntese de prostaglandinas no retículo endoplasmático liso e no sistema citocromo P-450 redutase microsomal (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2006; BERRA & MENCK, 2006).

Outra fonte endógena de EROs são os fagócitos, que destroem células infectadas por bactérias ou vírus, pela via da NADPH oxidase em células fagocíticas (neutrófilos, monócitos, macrófagos e eosinófilos) (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2006). Deste modo, as EROs também possuem um papel benéfico nos organismos aeróbios, fazendo parte da defesa imune primária (VALKO *et al.*, 2006).

Deve-se igualmente salientar que a geração intracelular de EROs, considerada normal em níveis fisiológicos, tem um importante papel vital, uma vez que essas espécies, nesses casos produzidas de forma controlada, atuam na regulação da sinalização celular e de expressão gênica, determinantes de mecanismos apoptóticos, e da diferenciação celular (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2006).

1.3 Defesas Antioxidantes

A produção contínua de EROs durante os processos metabólicos leva ao desenvolvimento de muitos mecanismos de defesa antioxidante para proteção, como

também sistemas de reparo, que previnem o acúmulo de moléculas alteradas pela oxidação (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2006). Como antioxidante entende-se qualquer substância capaz de, mesmo em concentrações relativamente baixas, retardar ou prevenir a oxidação de substratos oxidáveis (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2006).

Para proteger-se, a célula possui um sistema de defesa que pode atuar em duas linhas básicas (FERREIRA & MATSUBARA, 1997): 1) detoxificadora do agente antes que ele cause a lesão, constituída principalmente pela glutathiona reduzida (GSH), superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathiona peroxidase (GPx) e vitamina E; 2) reparadora de moléculas modificadas por EROs, constituída principalmente pelo ácido ascórbico (vitamina C), glutathiona redutase (GR) e pela glutathiona peroxidase (GPx).

Os antioxidantes também podem ser classificados como enzimáticos e não enzimáticos, conforme estrutura do agente antioxidante. As enzimas envolvidas na proteção antioxidante primária do organismo humano constituem uma proteção intrínseca e incluem principalmente a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT) e a glutathiona peroxidase (GPx) (CHANCE *et al.*, 1979).

Através da ação das enzimas antioxidantes, as células tentam manter baixas as quantidades do radical superóxido e de peróxido de hidrogênio, evitando assim a formação do radical hidroxil, que é altamente reativo e deletério às células (BOVERIS & CADENAS, 1997). A SOD converte o $O_2^{\bullet-}$ em H_2O_2 (FRIDOVICH, 1974). A catalase converte o H_2O_2 a H_2O e O_2 , enquanto a GPx converte o H_2O_2 , ou outros hidroperóxidos, até H_2O , com oxidação da glutathiona reduzida (GSH) para formar a glutathiona oxidada (GSSG) (CHANCE *et al.*, 1979).

Ainda há enzimas detoxificadoras (Fase II do processo de biotransformação), como a glutathiona-S-transferase (GST), as quais agem detoxificando agentes alquilantes, incluindo herbicidas, pesticidas e outros xenobióticos, através da catalização da reação de conjugação da glutathiona em sua forma reduzida (GSH) a estes compostos, aumentando a sua solubilidade e, assim, facilitando a sua excreção (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2006). A GR catalisa a redução da glutathiona oxidada (GSSG) para formar glutathiona reduzida (GSH), mantendo elevada a razão GSH/GSSG nas células (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2006).

Além dos antioxidantes enzimáticos, moléculas de baixo peso molecular possuem a capacidade de captar EROs via auto-oxidação, como o tripeptídeo GSH,

o tiol não protéico mais abundante nas células dos mamíferos e demais organismos aeróbios, podendo ser encontrado em muitos tecidos, compartimentos celulares e sub-celulares (WILHELM FILHO *et al.*, 2000). Protege o dano oxidativo por meio de distintos mecanismos: reagindo com as EROs; restaurando moléculas lesadas, cedendo-lhes hidrogênio; estabilizando as estruturas das membranas, pela eliminação dos peróxidos formados; mantendo os grupos tióis das proteínas em sua forma reduzida (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2006). Também atua como substrato ou cofator de diversas enzimas protetoras como a GPx e a GST. Além disso, a GSH atua como agente redutor, reciclando o ácido ascórbico de sua forma oxidada à sua forma reduzida, reação essa mediada pela enzima desidroascorbato redutase (ROVER JÚNIOR *et al.*, 2001).

Outros compostos de baixo peso molecular que possuem importante ação antioxidante são o ácido úrico, bilirrubina, albumina, estradiol e coenzima Q ou ubiquinol (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2006).

Dos componentes não enzimáticos da defesa antioxidante destacam-se alguns minerais (cobre, manganês, zinco, selênio e ferro), vitaminas (ácido ascórbico, vitamina E, vitamina A, riboflavina), carotenóides (beta-caroteno, licopeno e luteína, entre outros) e bioflavonóides (genisteína, quercetina, etc.), além de outros componentes antioxidantes presentes em diversas espécies de plantas como *Ginkgo biloba* (PAPAS, 1999; LEITE & SARNI, 2003).

1.3.1 Vitamina E

O termo vitamina E é descrito como uma família de oito antioxidantes sintetizados por plantas, quatro tocoferóis (α , β , γ , e δ) e quatro tocotrienóis (também α , β , γ , e δ). Apenas o α -tocoferol (Figura 08) é encontrado no plasma humano e tecidos, como resultado da função da proteína de transferência hepática de α -tocoferol (TRABER *et al.*, 2005).

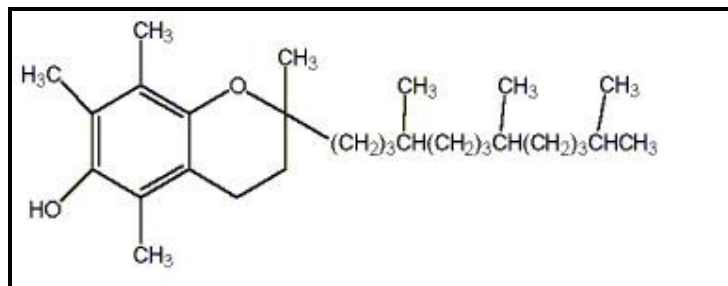


Figura 08 – Estrutura química do α -tocoferol. Fonte: wikipoly.files.wordpress.com.

Dentre todos os tocoferóis conhecidos, o α -tocoferol tem sido considerado o biologicamente mais ativo, inclusive no que diz respeito à sua atividade antioxidante, por ser o principal antioxidante lipossolúvel nas membranas celulares, sendo que a forma de ocorrência natural biologicamente mais ativa é o d- α -tocoferol ou RRR- α -tocoferol, enquanto que a quimicamente sintetizada é designada de dl- α -tocoferol ou todo-rac- α -tocoferol (PRYOR, 2000).

A absorção da vitamina E requer secreções biliares e pancreáticas normais, da formação de micelas e do transporte através das membranas intestinais. No fígado, uma proteína de transferência α -tocoferol, a α -TTP, seleciona preferencialmente o α -tocoferol. Desta forma, mesmo com taxas de absorção similar, a disponibilidade dos estereoisômeros da vitamina E nos tecidos difere, devido às diferenças metabólicas pós-absortivas (TRABER, 2003).

A incorporação plasmática do RRR- α -tocoferol é um processo saturável. Os níveis plasmáticos da vitamina E giram em torno de no máximo 80 μ M, apesar da dosagem >800 mg RRR- α -tocoferol ou 1320 mg todo-rac- α -tocoferol/dia (DIMITROV *et al.*, 1991), ou seja, em indivíduos com concentrações normais desta vitamina, seus níveis não aumentam mais que 2 a 3 vezes, independente da quantidade e da duração da suplementação (TRABER *et al.*, 1994).

A vitamina E é considerada a primeira linha de defesa da peroxidação lipídica, por proteger ácidos graxos poliinsaturados nas membranas celulares do ataque de EROs pelo seqüestro de radicais peroxil (ROO^\bullet) e alcoxil (RO^\bullet), levando ao término da reação em cadeia da lipoperoxidação por formar um aducto não radicalar (Figura 09). Neste processo, o α -tocoferol atua doando um átomo de hidrogênio para estes radicais, derivados da oxidação de ácidos graxos. Além disso, tocoferóis reagem e

eliminam o oxigênio singlete e protegem a membrana contra essas espécies (SIES, 1991; HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2006).

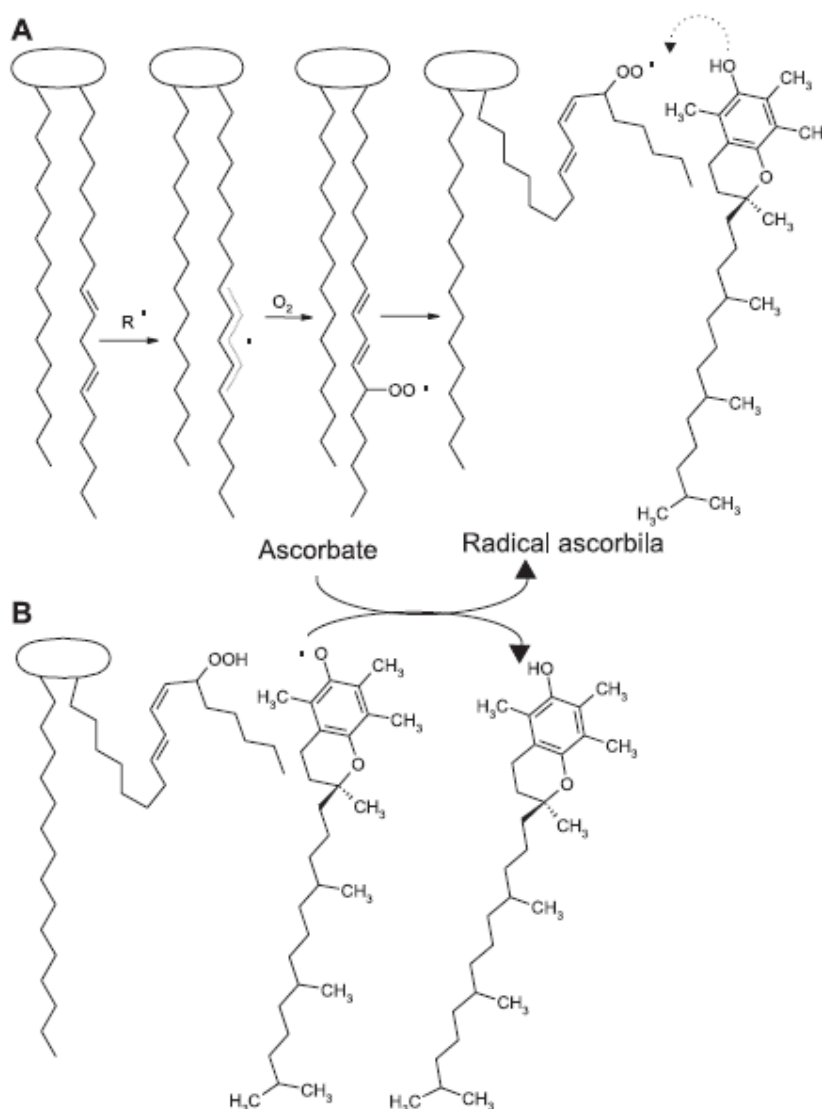


Figura 09 – Etapas da lipoperoxidação e ação antioxidante do α - tocoferol. (A) Iniciação: o grupo metileno dos ácidos graxos poliinsaturados é atacado por radicais livres, havendo o rearranjo das duplas ligações na forma de dieno conjugado. Simultaneamente a formação de um radical alquila (R) no carbono central. O radical alquila reage com O₂ formando alquilperoxila (ROO). Propagação: ROO ataca outras moléculas de lipídios. Terminação: as reações em cadeia são interrompidas por interação entre radicais e α - tocoferol, originando produtos não radicalares e o radical tocoferila. O radical α - tocoferila é reduzido por ação do ácido ascórbico. (Cerqueira *et al.*, 2007).

A evidência de que micronutrientes e antioxidantes protegem contra o dano oxidativo a tecidos é extensa (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2006). Entretanto, questões quanto à toxicidade de mega doses devem ser consideradas,

principalmente pelo fato do potencial da substância em exacerbar um estado patológico pré-existente e sua capacidade de ação antioxidante específica sobre um órgão ou estado do organismo.

Kappus e Diplock (1992) concluíram em uma revisão sobre a segurança da vitamina E, que uma ingestão entre 100-300 mg/dia pode ser considerada isenta de toxicidade para indivíduos saudáveis, e riscos de efeitos adversos poderia acontecer somente com ingestão acima de 3g/dia.

Estudos sugerem que a suplementação com vitamina E pode contribuir, em muitas situações, para reduzir os riscos de infecção crônica, doença de Alzheimer, alguns tipos de câncer, degeneração macular relacionada à idade, doenças cardiovasculares e hepatite C (JIALAL & DEVARAJ, 2003; HINO *et al.*, 2006; VON HERBAY *et al.*, 1997; MURAKAMI *et al.*, 2006), além de diminuir o estresse oxidativo em pacientes chagásicos crônicos (DE OLIVEIRA *et al.*, 2007; MAÇAO *et al.*, 2007).

A suplementação com vitaminas e minerais, por sua vez, está preconizada somente no caso de aporte insuficiente na alimentação, na prática de esportes de alta performance, ou em determinadas patologias, não excedendo às quantidades recomendadas pelo Conselho Nacional de Pesquisa dos EUA – *Recommended Dietary Allowances* (RDA) (SILVA & NAVES, 2001), em certas situações fisiológicas e em situações clínicas específicas (HUNT, 1996; ZEIZEL, 2000). A ingestão de quantidades um pouco acima daquelas recomendadas, porém não ultrapassando o limite superior tolerável de ingestão (UL), sendo que o UL da vitamina E é 1000mg/dia, a qual parece ser segura e saudável em situações específicas, como no caso das doenças hepáticas crônicas (NAS, 2001; KAPPUS & DIPLOCK, 1992).

1.3.2 Vitamina C

A vitamina C (ácido ascórbico) (Figura 10) é essencial na dieta, pois os seres humanos, bem como a maioria dos vertebrados, não a sintetizam (WILHELM FILHO *et al.*, 2000). Sua ingestão diária deve ser igual à quantidade excretada ou consumida pela oxidação, sendo que indivíduos adultos saudáveis perdem cerca de 3 a 4% de sua reserva corporal diariamente (FRIEDMAN & ZELDEL, 1999). Em baixas concentrações, a sua absorção é rápida e eficiente; quando as quantidades aumentam, a absorção vai diminuindo proporcionalmente à dose, sendo que a

máxima absorção é obtida com ingestões espaçadas de menos de 1 g ao longo do dia. A eliminação desta vitamina ocorre por via urinária e doses acima de 2 g ou mais por dia podem causar diarreia osmótica em alguns indivíduos, além de outros efeitos adversos como excesso de absorção de ferro, deficiência de vitamina B₁₂ e formação de pedras nos rins (JACOB, 2003). Conforme as recomendações do Conselho Nacional de Pesquisa dos EUA – *Recommended Dietary Allowances* (RDA), a ingestão diária por indivíduos adultos saudáveis e não tabagistas (20 a 60 anos) é de 75 mg para mulheres e 90 mg para homens, e o UL de 2 g (NAS, 2001). Esta nova dosagem limite foi aumentada há poucos anos em consequência do reconhecimento do seu papel antioxidante.

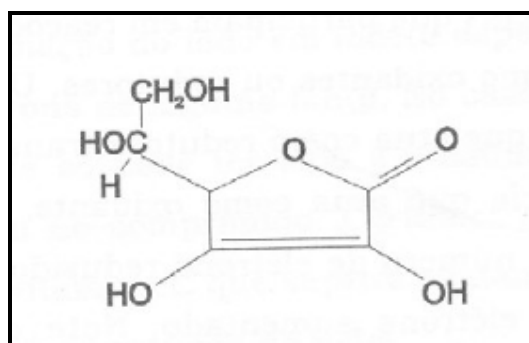


Figura 10 – Estrutura química do ácido ascórbico. Fonte: www.furg.br

Considerada o principal antioxidante hidrossolúvel, atuando na fase aquosa como um antioxidante sobre as EROs, protegendo moléculas indispensáveis ao organismo, como proteínas, lipídios, carboidratos e ácidos nucleicos de danos oxidativos (LEITE & SARNI, 2003), o ácido ascórbico reage rapidamente com radical hidroxil ($\cdot\text{OH}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), e radical superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$) originando os radicais semidehidroascorbato ou radical ascorbil (A^-) e dehidroascorbato (A) (KITTS, 1997). Neutraliza ainda o oxigênio singlete, reduz radicais tiil e combina rapidamente com o ácido hipocloroso, um poderoso oxidante gerado no local de processos inflamatórios (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2006; WILHELM FILHO *et al.*, 2000). Com esta ação antioxidante, o ascorbato pode captar os radicais de oxigênio, que de outra forma, reagiriam para formar os peróxidos lipídicos (JACOB, 2003). Apesar de seu poder antioxidante *per se* ser relativamente baixo, a principal ação da vitamina C está envolvida na reciclagem do α -tocoferoxil em α -tocoferol, resultando no fracamente reativo radical ascorbil (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2006). Por outro lado, estudos *in vitro* mostraram que essa vitamina, em baixa

concentração e na presença de metais de transição, tais como ferro, pode atuar como molécula pró-oxidante e gerar H_2O_2 e O_2^{\bullet} (POLJSAK *et al.*, 2005). Em dieta com restrição de vitamina C, tem sido reportada uma diminuição do conteúdo de vitamina E nos tecidos, o que reforça a hipótese do trabalho sinérgico das vitaminas E e C na proteção contra a peroxidação lipídica. A fraca reatividade deste radical é a razão para muitos de seus efeitos antioxidantes (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2006).

1.3.3 Zinco

O zinco (Zn) é um elemento traço-essencial para os humanos, presente em mais de 300 enzimas (incluindo a SOD) e proteínas que participam do metabolismo de proteínas, carboidratos, lipídios e ácidos nucleicos, podendo ter função catalítica ou estrutural (WOOD, 2000).

O termo “dedos de zinco” (zinc fingers) é amplamente utilizado para identificar qualquer estrutura compacta que é estabilizada por íons de Zn, geralmente pequenas proteínas, que estão envolvidas nos processos de replicação e reparo, transcrição e translação, metabolismo e sinalização, proliferação celular e apoptose (KRISHNA *et al.*, 2003).

A absorção do zinco ocorre principalmente no intestino delgado, sendo a maior parte provavelmente absorvida no jejuno. A quantidade de zinco absorvida da alimentação constitui a principal forma de seu controle corporal. Não existe uma reserva específica de zinco no organismo. Em todas as espécies estudadas, uma diminuição acentuada na ingestão de zinco é acompanhada em seguida por sinais de deficiência. A ingestão reduzida associada com deficiência causa catabolismo do tecido muscular e liberação do zinco para a corrente sanguínea (YUYAMA *et al.*, 2005).

Cabe ressaltar, no entanto, que a resposta inflamatória e a proliferação de EROs afetam a interação, excreção, utilização, distribuição e o depósito de vitaminas e minerais antioxidantes (BERGER, 2005).

O íon Zn (Zn^{2+}) possui um orbital d completo (d^{10}), impossibilitando a sua participação em reações de óxido-redução, mas permitindo que ele seja o acceptor de um par de elétrons. Assim, o zinco funciona como cofator em reações que necessitam de um íon redox-estável (ONOSAKA *et al.*, 2002).

O zinco participa da estrutura de uma proteína denominada metalotioneína, que tem propriedades antioxidantes e imunomodulatórias, inibindo a propagação de EROs através de ligações seletivas de íons de metais pró-oxidantes, como ferro e cobre, e dos potencialmente tóxicos como mercúrio e cádmio (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2006). Além disso, o Zn é o componente estrutural da superóxido dismutase, presente no citoplasma de todas as células e que catalisa a conversão do íon $O_2^{\bullet-}$ em H_2O_2 , reduzindo a toxicidade das EROs (MCCORD & FRIDOVICH, 1969; POWELL, 2000; TAPIEIRO *et al.*, 2003). O zinco e o cobre são considerados importantes cofatores da SOD, sendo assim, atuam indiretamente no controle da produção de EROs, evitando seus efeitos deletérios (EVANS & HALLIWELL, 2001).

Os mecanismos de ação antioxidante ainda são desconhecidos, mas as evidências disponíveis indicam ação desse mineral envolvendo vários mecanismos. Esses mecanismos incluem a regulação da expressão de metalotioneína, a atividade da enzima superóxido dismutase e a proteção de grupamentos sulfidril de proteínas de membranas celulares por antagonismo com metais pró-oxidantes como cobre e ferro. A ação antioxidante deste mineral é indireta, uma vez que o íon Zn não é ativo em reações de óxido-redução, conforme mencionado anteriormente.

Em geral, o mecanismo de ação antioxidante do zinco pode ser dividido em efeitos agudos e crônicos. Os efeitos agudos envolvem geralmente dois mecanismos: a) proteção dos grupamentos sulfidril de proteínas ou redução na formação de HO^{\bullet} de H_2O_2 e $O_2^{\bullet-}$, por antagonismo na atividade redox de metais de transição; b) efeitos crônicos envolvem uma exposição do organismo a este metal por um período prolongado, resultando na indução de alguma outra substância que é o antioxidante ultimato, sendo a mais conhecida, a metalotioneína, uma proteína de baixo peso molecular (6000-7000 kDa), rica em resíduos de cisteína (25%-30%), porém sem ligações dissulfeto (POWELL, 2000). A metalotioneína inibe reações de propagação de EROs, desta forma o zinco atua reduzindo a ação oxidante de metais pró-oxidantes conferindo estabilidade das membranas celulares por meio da prevenção da peroxidação lipídica (ROSTAN *et al.*, 2002).

Recentemente, tem sido levantada a hipótese de que a regulação da síntese de metalotioneína é onexo entre o estado nutricional em zinco e o estado redox das células. Sob condições de elevado estresse oxidativo, como um mecanismo de defesa, moléculas de baixo peso molecular, como o tripeptídeo GSH, podem

interagir com a metalotioneína e liberar Zn, que conseqüentemente pode reagir com outros metais pró-oxidantes, prevenindo uma reação em cadeia (MARET, 2000).

Além da atividade antioxidante, o zinco apresenta impacto sobre mediadores da imunidade, como enzimas, peptídeos tímicos e citocinas, além de influenciar a secreção de timulina, portanto, regula a função imune mediada pelas células tipo T (BHASKARAM, 2002; DARDENE, 2002).

Sendo assim, a suplementação de zinco tem sido sugerida como necessária naqueles indivíduos com deficiência, quando o aumento das perdas está presente ou quando em algumas patologias é evidenciado o estresse oxidativo, devendo-se evitar-se altas doses de reposição, considerando que a UL do zinco é >40mg/dia, em conseqüência dos efeitos clínicos adversos, como dor abdominal, diarreia, náusea e vômitos, além de deficiência de cobre (NAS, 2001).

1.4 Estresse Oxidativo

A condição fisiológica da célula exige equilíbrio entre as condições pró-oxidantes e antioxidantes, sendo o rompimento deste equilíbrio denominado de estresse oxidativo (Sies, 1985), tendo como conseqüência danos às moléculas como DNA, os lipídios, às proteínas e carboidratos (SIES, 1993; CROFT, 1998). O estresse oxidativo pode resultar não apenas de uma maior concentração de EROs, sem um concomitante aumento das defesas antioxidantes, mas também pode ocorrer devido a uma diminuição das defesas antioxidantes sem o aumento das EROs, ou ainda, pelo aumento das EROs paralelo a uma diminuição das defesas antioxidantes (SIES, 1985).

Em geral, a geração de EROs em níveis fisiológicos atua na regulação da sinalização celular e da expressão gênica (BOVERIS & CADENAS, 1997; BARZILAI & YAMAMOTO, 2004). Entretanto, mesmo em condições fisiológicas as EROs causam danos às biomoléculas, como proteínas, carboidratos, lipídios e DNA (EVANS *et al.*, 2004), o que se acentua em condições de estresse oxidativo (SIES, 1985). No entanto, enquanto lipídios, proteínas e carboidratos podem ser removidos via degradação, o mesmo não deve ocorrer com o DNA, uma vez que é a molécula responsável por todas as informações genéticas das células. O acúmulo de lesões no DNA tem conseqüências para a célula, relacionadas à mutagênese e carcinogênese (MOREL *et al.*, 2001).

Os danos oxidativos induzidos nas células e tecidos têm sido relacionados com a etiologia de várias doenças degenerativas como as cardiopatias, aterosclerose, Alzheimer, inflamações crônicas, diabetes mellitus, entre outras (STAHL & SIES, 1997; SORG, 2004; HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2006; NORDBERGER & ARNÈR, 2001; GRIENDLING & FITZGERALD, 2003).

1.4.1 Dano ao DNA

A indução de danos oxidativos nas bases do DNA ocorre a partir da sua reação com as EROs (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2006). Essas lesões podem ocorrer devido à oxidação direta dos ácidos nucléicos ou, muitas vezes, podem levar à formação de quebras em uma ou nas duas cadeias de DNA (quebras simples – SSB *single strand break*; quebras duplas – DSB *double strand break*), especialmente pelo radical hidroxil. Como exemplo de bases nitrogenadas oxidadas, tem-se a oxidação da guanina, que leva à formação de 8-oxo-7,8-diidro-2'-deoxiguanosina (8-oxoGuo) (CADET *et al.*, 2003).

A guanina oxidada tem grande importância biológica, uma vez que pode causar emparelhamento errôneo com a adenina (A), gerando uma transversão de GC para TA. Sabe-se que o reparo de DNA está intimamente interligado com regulação do ciclo celular, transcrição e replicação. Quando o tipo e quantidade de danos superam a capacidade de reparo das células, esses mecanismos celulares essenciais podem ser afetados. Sendo assim, caso essas lesões não sejam removidas, podem levar as células à morte, ou resultarem na incorporação de mutações no genoma, sendo transmitidas para gerações futuras, podendo gerar instabilidade genômica a até câncer (COSTA *et al.*, 2003; EVANS & COOKE, 2004).

1.4.2 Peroxidação Lipídica

Uma das conseqüências mais estudadas do estresse oxidativo é a peroxidação lipídica, que constitui uma reação em cadeia nos ácidos graxos poliinsaturados das membranas celulares, alterando a permeabilidade, fluidez e integridade das mesmas (BOWLES *et al.*, 1991; GOODE *et al.*, 1995).

Os ácidos graxos poliinsaturados (AGPI) caracterizam-se por possuírem ao longo de suas cadeias, mais de uma ligação dupla entre os átomos de carbonos, os

quais são vulneráveis ao ataque dos radicais livres, principalmente ao radical hidroxil ($\cdot\text{OH}$). A interação lipídio-radical gera peróxidos, os quais também são EROs, iniciando a redução de outro ácido graxo, caracterizando assim a reação em cadeia (GUTTERIDGE & HALLIWELL, 1990).

Uma característica das reações de peroxidação lipídica é a ocorrência de reações em cadeia as quais, se não terminadas, ocorrem continuamente, destroem fases lipídicas, alterando especialmente membranas e modificam partículas de lipoproteínas (SIES, 1985). A peroxidação lipídica é representada pelas etapas de iniciação, propagação e terminação (THOMAS, 2003):

$\text{LH} + \text{OH}\cdot$ (ou $\text{LO}\cdot$)	\longrightarrow	$\text{L}\cdot + \text{H}_2\text{O}$ (ou LOH)	Iniciação
$\text{L}\cdot + \text{O}_2$	\longrightarrow	$\text{LOO}\cdot$	Propagação
$\text{LH} + \text{LOO}\cdot$	\longrightarrow	$\text{L}\cdot + \text{LOOH}$	Propagação
$\text{LOO}\cdot + \text{L}\cdot$	\longrightarrow	LOOL	Terminação
$\text{LOO}\cdot + \text{LOO}\cdot$	\longrightarrow	$\text{LOOL} + \text{O}_2$	Terminação

Figura 11 – Etapas da peroxidação lipídica (Batista *et al.*, 2009).

Etapa 1 - Iniciação: seqüestro do H do ácido graxo poliinsaturado (LH) da membrana celular. Tal seqüestro pode ser realizado pelo $\cdot\text{OH}$ ou pelo radical alcóxil ($\text{RO}\cdot$), com conseqüente formação do $\text{L}\cdot$ (radical lipídico).

Etapa 2 - Propagação: este radical lipídico ($\text{L}\cdot$) por ser instável, forma um dieno conjugado, o qual incorpora rapidamente uma ou mais moléculas de oxigênio (O_2) e transforma-se em radical peróxil ($\text{ROO}\cdot$).

Etapa 3 - Propagação: o radical peróxil ($\text{ROO}\cdot$) interage com outra molécula de ácido graxo (LH), retira o seu hidrogênio e origina um hidroperóxido (LOOH) e mais um novo radical lipídico ($\text{L}\cdot$) livre, formando-se, então, uma típica reação em cadeia.

Etapa 4 - Terminação: O mais importante passo na terminação aeróbica é a interação de radicais peróxidos ($\text{ROO}\cdot$), formando oxigênio estável (O_2) e produtos não radicais (LOOL) (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2006).

A oxidação dos AGPI dos fosfolípidios das membranas pode produzir radicais livres adicionais, que, por sua vez, estimulam a peroxidação lipídica e lesões teciduais (LATHA & BABU, 2001).

Os produtos principais desta degradação compreendem os derivados da decomposição de hidroperóxidos como álcoois, aldeídos, cetonas e outros hidrocarbonetos. A dosagem do malondialdeído (MDA), através do teste do ácido tiobarbitúrico (TBA) é amplamente utilizada como indicador específico da ocorrência de lipoperoxidação (BIRD & DRAPER, 1984).

1.4.3 Dano às proteínas

A oxidação de proteínas é um processo bastante complexo, definido como a modificação covalente de uma proteína, induzida diretamente pelas EROs ou indiretamente pela reação de produtos secundários do estresse oxidativo (ULRICH & CERAMI, 2001). É importante salientar que níveis elevados de carbonilação protéica são indicadores não somente de estresse oxidativo, mas também de doenças derivadas do metabolismo protéico (DONNE *et al.*, 2003).

A exposição das proteínas ao ataque de EROs resulta em múltiplas modificações nestas moléculas. Estas modificações incluem a oxidação dos grupos das cadeias laterais de aminoácidos, fragmentação, modificações na hidrofobicidade e na conformação e formação de novos grupos reativos (como os grupos carbonil). Além disso, este processo pode resultar na perda da estrutura ou atividade enzimática das proteínas (HAWKINS & DAVIES, 2001).

A carbonilação protéica parece ser um fenômeno comum durante a oxidação, e sua quantificação pode ser usada para medir a extensão do dano oxidativo (DONNE *et al.*, 2003), já que é um marcador estável de oxidação protéica. As cadeias laterais de todos os resíduos de aminoácidos das proteínas são suscetíveis à ação das EROs, principalmente a prolina (Pro), arginina (Arg), lisina (Lis) e treonina (Tre). Os grupamentos carbonil (C=O) (presentes em aldeídos e cetonas) são produzidos pela oxidação destas cadeias laterais de aminoácidos e também podem ser gerados através da clivagem oxidativa das proteínas, tanto por oxidação das cadeias laterais de glutamato quanto por α amidação, levando à formação de um peptídeo no qual o aminoácido N-terminal está bloqueado por um derivado α cetoacil. Do mesmo modo, derivados carbonil reativos (cetoaminas, cetoaldeídos), gerados como consequência da reação de açúcares redutores, podem levar à formação de grupos carbonil (DONNE *et al.*, 2003).

1.5 Estresse Oxidativo em Patologias Humanas

A “hipótese oxidativa das doenças” é um termo que deve ser entendido como a ocorrência da condição oxidativa da célula durante o processo patológico e não exclusivamente à existência do estresse oxidativo como etiologia da doença (RIBEIRO *et al.*, 2005). Na maioria das patologias humanas o estresse oxidativo é uma consequência e não uma causa do processo (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2006).

O dano tecidual causado por uma doença, trauma, infecção ou inflamação levam a liberação de “mediadores”, como as prostaglandinas, leucotrienos, interleucinas, interferons e fator de necrose tumoral (TNF), que podem ativar reações que liberam EROs, ou o oposto, as EROs podem estimular a produção dos mediadores inflamatórios (CROSS & HALLIWELL, 1994; HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2006; DRÖGE, 2002).

Em um organismo, tecido ou célula, frente a um estresse oxidativo, pode ocorrer os seguintes processos:

- adaptação, por aumento da resposta das defesas antioxidantes;
- dano tecidual por agressão a lipídios, carboidratos e proteínas;
- morte celular por necrose ou apoptose.

No caso da adaptação do sistema de defesa, diferentes respostas são geradas como proteção completa contra o dano, ou proteção incompleta contra a lesão ou “sub-proteção”, isto é, as células são resistentes ao alto nível de oxidantes (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2006).

A necrose é uma forma passiva de morte celular que causa inchamento celular e de organelas, rompimento da membrana plasmática e liberação de enzimas dos lisossomas e vazamento do conteúdo da célula para o meio extracelular, o que afeta as células adjacentes, já que estes conteúdos podem conter pró-oxidantes (cobre ou ferro livre, por exemplo), podendo impor agressão às células vizinhas e amplificar a lesão tecidual. Já a apoptose é uma forma de morte celular com características bioquímicas e morfológicas próprias, onde a célula ativa-se para a morte sem liberar seus conteúdos para as células vizinhas, o que diminui o dano adjacente (NAGATA, 2000; HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2006).

1.5.1 Estresse Oxidativo na Hepatite C

Diversas linhas de pesquisa suportam que o estresse oxidativo está envolvido na patogênese da hepatite C (WANG *et al.*, 2002; CHOI *et al.*, 2006; LOGUERCIO & FEDERICO, 2003; MACHIDA *et al.*, 2006; QADRI *et al.*, 2004; WANG & WEINMAN, 2006). Em geral três mecanismos contribuem para a associação entre VHC e estresse oxidativo: disfunção mitocondrial, estresse do retículo endoplasmático e explosão respiratória mediada por células imunes (WANG & WEINMAN, 2006).

A própria expressão gênica, proteínas estruturais e não estruturais do VHC, podem causar o aumento de EROs (KOLYKHALOV *et al.*, 1997). A glicoproteína E1 e *core* (nucleocapsídeo viral) parecem particularmente serem suficientes para produzir anormalidades mitocondriais e estresse oxidativo (OKUDA *et al.*, 2002). A proteína *core* tem múltipla localização celular e é largamente associada ao retículo endoplasmático, sendo o mesmo associado às mitocôndrias através de uma membrana de associação (MAM), um ponto de contato entre o retículo endoplasmático e a mitocôndria (KORENAGA *et al.*, 2005; SCHWER *et al.*, 2004). Portanto, estudos prévios têm demonstrado que o *core* pode causar despolarização do potencial de membrana mitocondrial, devido ao estresse causado no retículo endoplasmático, pelo aumento de Ca^{+2} intramitocondrial (KORENAGA *et al.*, 2005; MACHIDA *et al.*, 2006; WANG & WEINMAN, 2006). O aumento de Ca^{+2} mitocondrial tem sido associado ao aumento de EROs, possivelmente pela redução do fluxo de elétrons na cadeia respiratória ou alterando estruturas dos complexos de transporte de elétrons, principalmente o complexo I, que é o mais sensível ao dano oxidativo no transporte de elétrons (KORENAGA *et al.*, 2005).

Além do *core*, a proteína não estrutural NS5A, também têm sido reportada como capaz de alterar o estado redox da mitocôndria, pelo mesmo mecanismo de aumento Ca^{+2} intramitocondrial, causando portanto, um aumento das EROs (TARDIF *et al.*, 2005). Nos termos deste mecanismo, a expressão gênica *core* do VHC reduz as concentrações de GSH e NADPH mitocondrial. Como a GSH é transportada do citosol para mitocôndria, e a GSH mitocondrial é relativamente resistente à depleção, promove uma diminuição no transporte ou um aumento na utilização do GSH mitocondrial, além da diminuição da biossíntese do GSH, visto que o NADPH participa na reciclagem do GSSG para GSH, expressando o envolvimento do estresse oxidativo na patogênese da hepatite C (SERONELLO *et al.*, 2007).

A proteína não estrutural NS3 do VHC pode estimular a geração de EROs pela ativação da NADPH oxidase de fagócitos e acionar a apoptose e disfunção de células T e Nk, diminuindo a citotoxicidade destas células imunes, prejudicando o clareamento viral, contribuindo portanto, para a cronicidade da doença (THORÉN *et al.*, 2004). Também tem sido reportado que a proteína NS3 induz a formação de óxido nítrico ($\cdot\text{NO}$), que pode causar DSB nas cadeias de DNA, além de inativar a cadeia de transporte de elétrons e acionar o bloqueio de transferência de elétrons na cadeia respiratória e, portanto, romper o potencial de membrana mitocondrial, gerando EROs (MONCADA & ERUSALIMSKY, 2002).

Proteínas virais da hepatite C também são associadas à resistência ao interferon, utilizado no tratamento para hepatite C crônica, como a NS5A, que parece diretamente interagir com a cadeia de RNA – quinase dependente, impedindo a ação do interferon com a proteína não estrutural. Portanto, impede o clareamento viral, e conseqüentemente, a continuidade da produção de EROs (GALE *et al.*, 1998; FRANÇOIS *et al.*, 2000).

Além disso, pacientes com hepatite C exibem um aumento da produção de $\text{TNF}\alpha$, uma citocina que pode produzir estresse oxidativo por estimular a liberação de EROs, como H_2O_2 e $\text{O}_2^{\cdot-}$ (MACHIDA *et al.*, 2006). Dentre os muitos efeitos do $\text{TNF}\alpha$, é também considerada a iniciação de numerosas vias de sinalização intracelular envolvendo sinais apoptóticos e/ou anti-apoptóticos (GOCHÉE *et al.*, 2003). Logo, uma superprodução de $\text{TNF}\alpha$ pode ser responsável pela iniciação de processos apoptóticos, provavelmente pela ativação da via dependente do $\text{NF}\kappa\text{B}$ (Liu *et al.*, 2001). Estudos prévios também demonstraram que a proteína não estrutural NS5A pode funcionar como um ativador de fatores transcricionais, como STAT-3, através da indução da geração de EROs (KATO *et al.*, 1997; MAJUMDAR *et al.*, 2001; GHOSH *et al.*, 1999).

O $\text{NF}\kappa\text{B}$ encontra-se no citoplasma na sua forma latente $\text{I}\kappa\text{B}$, que durante o estresse oxidativo é ativada, sendo uma família de proteínas envolvida na patogênese do câncer, por controlar muitos genes envolvidos na transformação de células, proliferação e angiogênese (WARIS & AHSAN, 2006). Com a ativação do $\text{NF}\kappa\text{B}$, o mesmo pode ativar a ciclooxygenase-2 (COX-2), levando a um aumento de prostaglandinas (PGE_2), que pode inibir a apoptose de células tumorosas, induzir sua proliferação, promover metástase e estimular a angiogênese (WARIS &

SIDDIQUI, 2005). Similarmente, a indução da STAT-3 pela superprodução de EROs, induz transformações celulares por oncoproteínas e causa diferenciação das células B, particularmente na diferenciação terminal das mesmas (FORNEK *et al.*, 2006; HIRANO *et al.*, 2000). A figura 12 sumariza as hipóteses vias de indução de EROs pelo HCV.

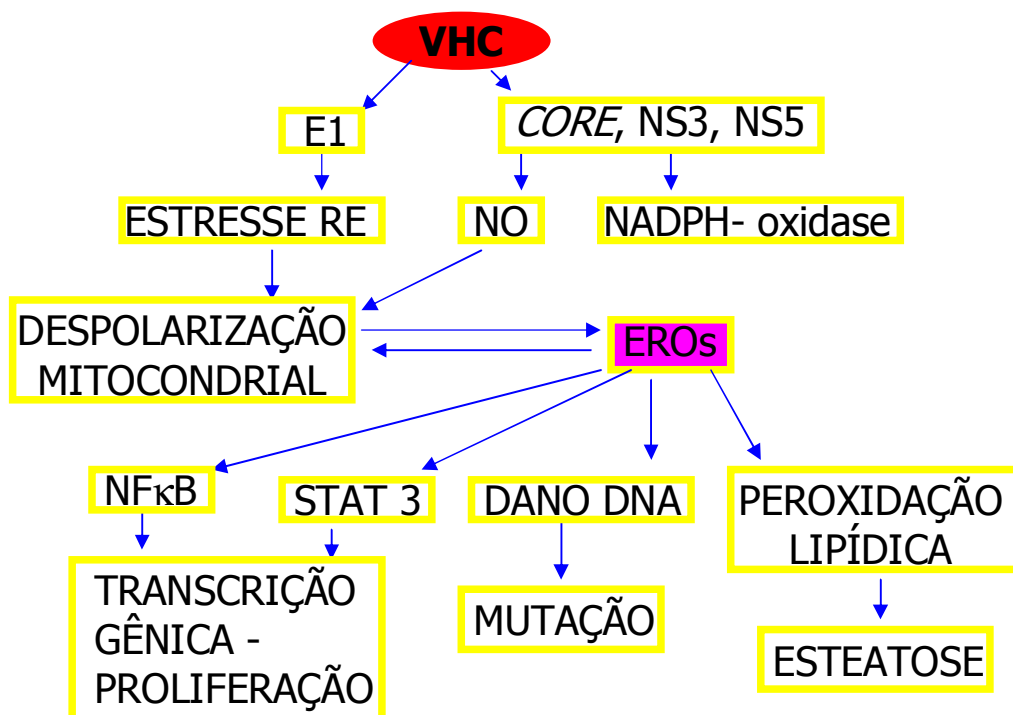


Figura 12 – Hipóteses de mecanismos mediados pelo VHC na indução de EROs (Adaptada de MACHIDA *et al.*, 2006).

Na hepatite C, as defesas antioxidantes do hospedeiro, como SOD, CAT, GPx e GST encontram-se aumentadas, sugerindo uma adaptação ao estresse oxidativo presente nos pacientes (ABDALLA *et al.*, 2005). Como consequência também do aumento da produção de EROs, foi observado um aumento da lipoperoxidação, oxidação de proteínas e um aumento do consumo de GSH (ABDALLA *et al.*, 2005).

Com base nas evidências citadas acima, o objetivo do presente trabalho foi avaliar o *status* antioxidante no sangue de pacientes com hepatite C crônica em tratamento com interferon associado à ribavirina acompanhados clinicamente no Hospital Nereu Ramos, após suplementação antioxidante diária de vitamina E, vitamina C e o mineral Zn durante 6 meses, no sentido de verificar sua eficácia em

termos de atenuar ou retardar o quadro de estresse oxidativo durante o tratamento para hepatite C.

2 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito da terapia antioxidante através da administração de suplementos de vitaminas C e E, e do mineral Zn, no estresse oxidativo de pacientes com hepatite C sem e com tratamento com interferon peguilado associado à ribavirina.

2.1 Objetivo Específicos

1. Verificar as diferenças nos níveis eritrocitários das defesas antioxidantes enzimáticas (CAT, SOD, GPx, GR e GST) presentes no sangue de pacientes com hepatite C sem e com tratamento com interferon peguilado associado à ribavirina, antes e depois da administração diária de vitamina E (800 mg), C (500 mg) e Zn (40mg) durante 6 meses.

2. Verificar as diferenças das defesas antioxidantes não enzimáticas (conteúdos sanguíneos de GSH e Zn e plasmáticos de vitamina E e vitamina C) presentes no sangue destes pacientes, antes e após o tratamento e, antes e depois da administração de vitamina E, C e do mineral Zn.

3. Verificar o comportamento dos indicadores de estresse oxidativo (níveis plasmáticos de TBARS e proteína carbonilada) nestes pacientes, antes e após o tratamento e, antes e depois da administração de vitamina E, C e do mineral Zn.

4. Avaliar a atividade da mieloperoxidase, um marcador do processo inflamatório presente no sangue destes pacientes, antes e após o tratamento e, antes e depois da administração de vitamina E, C e do mineral Zn.

5. Verificar a hepatotoxicidade e a lesão hepática (atividades enzimáticas da AST, ALT, ALP e GGT) nestes pacientes, antes e após o tratamento e, antes e depois da administração de vitamina E, C e do mineral Zn.

6. Comparar os resultados obtidos antes e após o tratamento e, antes e após a intervenção nutricional através da administração de suplementos de vitaminas E e C, e do mineral Zn, entre os diferentes grupos de pacientes.

2.2 Justificativa e Importância do Trabalho

Apesar de que nos últimos anos uma série de progressos foram realizados no estudo da hepatite C quanto à avaliação, prevenção e tratamento, a infecção pelo vírus VHC representa um grande desafio mundial para saúde pública, pois a eficácia do tratamento, interferon (convencional ou peguilado) em monoterapia ou associado à ribavirina, ainda estão longe dos valores ideais de taxas de resposta virológica sustentada (HADZIYANNIS *et al.*, 2004). Com isso, os focos dos estudos vêm sendo direcionados aos portadores de hepatite C crônicos, para o desenvolvimento de terapias com maior eficácia, redução dos efeitos colaterais dos tratamentos usuais, assim como para prevenção da evolução para cirrose e hepatocarcinoma (WHO, 2000; CONTE, 2000).

A infecção pelo vírus da hepatite C é de evolução variável, sendo que apenas 15% dos indivíduos com infecção aguda evoluem para cura. Portanto, cerca de 85% evoluem para forma crônica da doença, sendo sua evolução lenta, insidiosa e progressiva, aumentando as taxas de comorbidades (cirrose e hepatocarcinoma) e mortalidade, além do aumento dos números de transplantes hepáticos (CONTE, 2000).

Há várias evidências que sugerem que o vírus da hepatite C induz o estresse oxidativo, através de sua própria expressão genômica causando disfunção mitocondrial ou através do aumento de citocinas pró-inflamatórias que aumentam a produção de EROs (LEVENT *et al.*, 2006; WANG & WEINMAN, 2006). Estudos demonstram aumento de produtos da peroxidação lipídica, diminuição significativa das concentrações plasmáticas e eritrocitárias de GSH, assim como o aumento de GSSG, sugerindo aumento do *turnover* de GSH, além do aumento de outras enzimas antioxidantes, como CAT, GPx, GR e SOD (CHOI & OU, 2005; LEVENT *et al.*, 2006; KO *et al.*, 2005). Dessa forma, o presente trabalho pretendeu avaliar o *status* antioxidante do sangue de pacientes com hepatite C crônica antes e em tratamento com interferon associado à ribavirina após a suplementação antioxidante

com as vitaminas E, C e mineral Zn, no sentido de verificar sua eficácia em termos de atenuar ou retardar o estresse oxidativo associado a esta patologia.

A suplementação composta por vitaminas E, C e mineral Zn foi escolhida pelas características individuais de cada elemento e/ou por sua ação sinérgica, como das vitaminas E e C, considerando as dosagens referenciadas para uma ação antioxidante, porém com segurança, não ultrapassando a UL de cada micronutriente. A vitamina E, sendo considerada a primeira linha de defesa da peroxidação lipídica, por proteger ácidos graxos poliinsaturados nas membranas celulares do ataque de EROs pelo seqüestro de radicais peróxil (RO_2^\bullet) e alcóxil (RO^\bullet) (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2006); a vitamina C, por ser considerada o principal antioxidante nutricional hidrossolúvel, atuando na fase aquosa como um antioxidante sobre as EROs, protegendo moléculas indispensáveis ao organismo, como proteínas, lipídios, carboidratos e ácidos nucléicos de danos oxidativos, além de, principalmente estar envolvida na reciclagem da vitamina E (LEITE & SARNI, 2003); e o zinco, além de ser um aceptor de elétrons, por induzir a atividade da glutathione sintetase (CORTESE *et al.*, 2008), e participar da estrutura da metalotioneína, que tem propriedades antioxidantes e imunomodulatórias, inibindo a propagação de EROs através de ligações seletivas de íons de metais pró-oxidantes (POWELL, 2000).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Seleção dos Pacientes

Os pacientes com hepatite C em tratamento com interferon peguillado associado à ribavirina mencionados neste trabalho, são oriundos do Ambulatório de Nutrição do Instituto de Medicina do Sistema Digestivo Ilha de Santa Catarina e do Pólo do Hospital Nereu Ramos, localizados em Florianópolis, Santa Catarina. Os indivíduos saudáveis foram randomicamente recrutados do Banco de Sangue do Hospital Universitário de Florianópolis, sob responsabilidade do Dr. Jovino Ferreira dos Santos. Os pacientes com hepatite C sem tratamento foram recrutados do ambulatório de Infectologia da Policlínica II Unidade Centro de Florianópolis.

Os dados clínicos foram obtidos de modo consecutivo, à medida do arrolamento do paciente no ambulatório e através dos dados presentes nos prontuários. A avaliação inicial dos pacientes com hepatite C em tratamento com interferon peguillado associado à ribavirina decorreu após a décima segunda semana de tratamento e a avaliação dos pacientes com hepatite C sem tratamento decorreu após confirmação do diagnóstico de hepatite C por PCR, que consistiu em uma anamnese nutricional e exames bioquímicos, sendo estes realizados com intervalos não maiores do que 30 dias. Como norma de acompanhamento, nos pacientes com hepatite C, exames bioquímicos, como hemograma, plaquetas, ALT, AST, creatinina devem ser realizados a cada 15 (quinze) dias no primeiro mês, sendo que após esse período, os exames devem ser realizados mensalmente; TSH a cada 03 (três) meses e para mulheres em idade fértil em uso de ribavirina: beta-HCG a cada 03 (três) meses, devido, ou ao tratamento - cujos medicamentos utilizados alteram enzimas hepáticas, assim como a função imune do paciente - ou à própria evolução clínica da doença.

Após enquadramento quanto aos critérios de inclusão/exclusão, os pacientes foram informados sobre o estudo e o consentimento livre esclarecido foi obtido.

3.1.1 Critérios de inclusão

A- Homens ou mulheres com idade entre 20 a 60 anos.

B- Pacientes com hepatite C em tratamento com interferon peguilado associado à ribavirina, conforme critérios de inclusão da Portaria nº 34 de 28 de setembro de 2007, descrito a seguir, sob denominação protocolo clínico para tratamento de hepatite C.

C- Pacientes com hepatite C após a 12ª semana de tratamento com interferon peguilado associado à ribavirina.

D- Pacientes com sorologia positiva para VHC sem tratamento específico.

E - Indivíduos saudáveis, eutróficos, sendo soro negativos para VHC, HBV, HIV, HbsAg, anti-HBc total e anti-VHC.

F- Potencial de engravidar (se sexo feminino):

a) O sujeito da pesquisa não poderia ter potencial de engravidar, definido como: pós menopausa por pelo menos 1 ano ou cirurgicamente estéril (ligadura tubária bilateral, ooforectomia bilateral ou histerectomia).

b) Se com potencial de engravidar, deveria ter teste de gravidez negativo realizado na fase de seleção.

A inclusão ou não do paciente no projeto foi de espontânea responsabilidade do paciente, quando este assinava o termo de consentimento livre e esclarecido apresentado.

3.1.2 Critérios de exclusão

A- Estados fisiológicos, condições médicas prévias e/ou concomitantes

- presença de outras afecções patológicas sistêmicas associadas, tais como infecções ou neoplasias, desordens auto-imunes;
- dados clínicos ou biológicos sugestivos de doença renal crônica;
- alcoolismo crônico;
- co-infecção com HIV;
- pacientes com conhecida ou suspeita de hipersensibilidade a fármacos;
- pacientes que estavam participando de outros estudos;
- utilização prévia de suplementos que possuíam na sua composição vitaminas C e E, e/ou mineral zinco.

3.1.3 Dados obtidos

A- Anamnese e exame físico completos

- Dados constitucionais: data de nascimento (idade), sexo;
- Tempo de diagnóstico, modo de transmissão, genótipo;
- Uso de cigarros, de bebidas alcoólicas e medicamentos, atividade física;
- História patológica pregressa: outras doenças associadas;
- Dieta, peso corporal, altura, índice de massa corpórea, gasto energético basal, gasto energético total, recordatório alimentar de 24h e diário de frequência alimentar.

3.1.4 Caracterizações da Amostra

Tabela 01 – Características demográficas e clínicas dos grupos controle (negativo - GI e positivo GII) e grupo experimental (GIII).

Características	%			Média ± DP		
	GI	GI I	GI II	GI	GI I	GI II
Sexo						
Masculino	58,33	55,55	66,66			
Feminino	41,67	44,45	33,34			
Idade (anos)				39,91±11,76	45 ± 9,85	47±7,61
Atividade física	-	33,33	27,27			
Peso atual (kg)				-	69,8 ± 13,82	81,78±16,39
IMC (kg/m ²)				-	24,62 ± 4,73	27,89±3,7
NET (Kcal/dia)				-	2249,11 ± 235,2	2418,33 ± 371,72
Doenças associadas (DM)	-	22,22	-			

Resultados expressos em percentual e média ± DP.

A amostra foi composta de 32 indivíduos, sendo 12 indivíduos saudáveis; constituindo o grupo controle negativo – GI, oriundo do Banco de Sangue do HU; 9 pacientes com hepatite C sem tratamento específico, constituindo o controle positivo – GI I, e 11 pacientes com hepatite C em tratamento com interferon peguillado associado à ribavirina - GI II. A partir dos dados apresentados na tabela 01, verifica-se que os grupos foram parcialmente homogêneos em relação ao sexo e idade. Em relação ao peso dos indivíduos, observa-se que o grupo experimental – pacientes

com hepatite C em tratamento com interferon associado à ribavirina apresentou um peso de aproximadamente 15% maior que os pacientes com hepatite C sem tratamento específico – GII. Isto se reflete, conseqüentemente, no índice de massa corporal – IMC, onde foi verificado que o controle positivo – GII encontra-se no estado nutricional de eutrofia, enquanto que o grupo experimental – GIII apresentou sobrepeso.

Na tabela 02, podem ser observados as características do grupo controle positivo – GII e grupo experimental – GIII, quanto à doença causada pelo vírus VHC. Em relação ao tempo de diagnóstico, observa-se que o grupo experimental - GIII, apresentou um tempo menor que o GII - controle positivo, além de apresentarem predominantemente o genótipo 1, sendo este um fator considerado evolutivo de um pior prognóstico na evolução da doença. Embora o controle positivo também apresentar um predomínio do genótipo 1, o percentual de pacientes com este genótipo foi menor que o grupo experimental. Quanto ao modo de transmissão do vírus HCV, verificou-se o predomínio da transfusão no grupo experimental e de forma desconhecida no grupo controle positivo.

Tabela 02 – Características clínicas da hepatite C no grupo controle positivo – GII e grupo experimental - GIII.

Características	%		Média ± DP	
	G II	G III	G II	G III
Tempo diagnóstico (anos)			5,00±5,90	3,86 ± 3,50
Genótipo				
1	66,66	93,33		
2 e 3	33,34	6,66		
Modo de Transmissão				
Transfusão		46,66		
UDI		13,33		
Material contaminado (dentista)	22,22	13,33		
Acidente ocupacional	22,22	6,68		
Desconhecido	55,56	20,00		

Resultados expressos em percentual e média ± DP.

3.1.5 Definições

A hepatite viral C, pela sua magnitude, diversidade virológica, formas de transmissão, evolução clínica, além da sua complexidade diagnóstica e terapêutica, demanda, por parte dos gestores do Sistema Único de Saúde (SUS), políticas específicas no campo da saúde pública.

O Programa Nacional de Hepatites Virais (PNHV/DEVEP/SVS) criado para desenvolver e executar ações específicas referentes às hepatites virais tem como objetivo coordenar as ações desenvolvidas nas outras esferas do Ministério da Saúde. Desta forma, o PNHV, por meio da Portaria nº 34 de 28 de setembro de 2007, estabelece o protocolo clínico-terapêutico para hepatite crônica C.

3.1.5.1 Protocolo clínico para tratamento de hepatite C

Foram incluídos no Protocolo de Tratamento aqueles pacientes que possuíam todas as seguintes características:

- Hepatite Viral Aguda C

a) Critérios diagnósticos para Hepatite aguda pelo VHC:

a.1. Soroconversão anti-VHC documentada, em paciente com quadro clínico de Hepatite Aguda (paciente que no início dos sintomas apresenta anti-HCV negativo e que converte para anti-VHC positivo na segunda dosagem - realizada com intervalo de 90 dias);

a.2. Quadro laboratorial de anti-VHC negativo com detecção do VHC-RNA por biologia molecular (qualitativo), realizado por volta de 90 dias após o início dos sintomas ou da data de exposição, quando esta for conhecida em paciente com histórico de exposição potencial ao vírus da hepatite (VHC).

b) A biópsia hepática só é justificada, nesta situação, em caso de dúvidas diagnósticas.

- Hepatite Viral Crônica C

a) ser portador do VHC - Detecção do VHC-RNA por biologia molecular (qualitativo);

b) ter realizado, nos últimos 24 meses, biópsia hepática onde tenham sido evidenciadas as seguintes características:

b.1. Atividade necro-inflamatória de moderada a intensa (maior ou igual a A2 pela classificação Metavir ou atividade portal ou peri-septal grau 2 ou maior pela classificação da Sociedade Brasileira de Patologia) e;

b.2. Presença de fibrose de moderada a intensa (maior ou igual a F2 pelas classificações Metavir ou Sociedade Brasileira de Patologia);

c) ter entre 12 e 70 anos; e

d) ter contagem de plaquetas acima de $50000/\text{mm}^3$ e de neutrófilos acima de $1500/\text{mm}^3$.

Não foram incluídos no Protocolo de Tratamento, tanto com interferon-alfa como também com interferon peguilado, pacientes com as seguintes características:

a) tratamento prévio com interferon peguilado (associado ou não à ribavirina);

b) consumo abusivo de álcool nos últimos 6 meses;

c) hepatopatia descompensada;

d) cardiopatia grave;

e) doença da tireóide descompensada;

f) neoplasias;

g) diabetes mellitus tipo 1 de difícil controle ou descompensada;

h) convulsões não controladas;

i) imunodeficiências primárias;

j) homens e mulheres sem adequado controle contraceptivo;

k) gravidez (beta-HCG positivo).

3.1.6 Avaliação Nutricional

Realizou-se o cálculo das necessidades nutricionais, assim como avaliação nutricional através dos dados antropométricos e de avaliação do consumo alimentar.

3.1.6.1 Antropometria

Incluiu a avaliação do peso, altura e cálculo do índice de massa corporal. Os pacientes foram pesados em uma balança da marca Welmy®, modelo 110, capacidade máxima de 150 kg e mínima de 2 kg, especificidade de 100g. A estatura foi avaliada por estadiômetro próprio da balança referenciada acima, segundo as recomendações da OMS (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 1998). Com os dados de peso e estatura, foi calculado o índice de massa corporal (IMC), que consiste no peso em kg, dividido pelo quadrado da estatura em metros. A avaliação

do estado nutricional dos pacientes foi diagnosticada conforme recomendações da OMS (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 1998), como seguem:

- $20 \text{ kg/m}^2 \leq \text{IMC} < 24,9 \text{ kg/m}^2$: peso normal ou eutrófico;
- $25 \text{ kg/m}^2 \leq \text{IMC} < 29,9 \text{ kg/m}^2$: sobrepeso;
- $30 \text{ kg/m}^2 \leq \text{IMC} < 34,9 \text{ kg/m}^2$: obesidade grau I;
- $35 \text{ kg/m}^2 \leq \text{IMC} < 39,9 \text{ kg/m}^2$: obesidade grau II;
- $\text{IMC} \geq 40 \text{ kg/m}^2$: obesidade grau III.

3.1.6.2 Avaliação do Consumo Alimentar

Foi realizado anamnese nutricional, o recordatório alimentar de 24h e o questionário de frequência alimentar (Apêndice I) para cálculo da ingestão alimentar e conhecimentos dos hábitos alimentares dos pacientes do estudo, com a finalidade de terapia nutricional preservando os hábitos alimentares dos pacientes em estudo.

3.1.6.3 Determinação das necessidades nutricionais e terapia nutricional

As necessidades energéticas foram calculadas de acordo com a Equação de Harris-Benedict (1919), por considerar o estado patológico do paciente, uma vez que considera a taxa de metabolismo basal (TMB), multiplicada pelo Fator Atividade (FA), pelo Fator de Lesão (FL) e pelo Fator Térmico (FT), sendo empregado como fator de lesão o valor de 1,4 e o fator térmico de 1,1.

- **Homens:** $\text{TMB} = 66,47 + (13,75 \cdot P^*) + (5,00 \cdot A^*) - (6,76 \cdot I^*)$
- **Mulheres:** $\text{TMB} = 655,1 + (9,56 \cdot P^*) + (1,85 \cdot A^*) - (4,68 \cdot I^*)$

* P = Peso em Kg/ *I = Idade em anos/ *A = Altura em cm

➤ Gasto Energético Total: $\text{TMB} \times \text{FA} \times \text{FL} \times \text{FT}$

A partir das avaliações antropométricas e energéticas foi estabelecido um plano alimentar normocalórico, normoproteico, normoglicídico e normolipídico, segundo as recomendações de macronutrientes e micronutrientes da DRI's (NAS, 2001), sendo calculado pelo programa NUTWIN da Universidade Federal de São Paulo, versão 1.5.2.51-2005, utilizando-se como base de dados da composição química dos alimentos a tabela TACO, UNICAMP, versão 2. O período de intervenção nutricional foi de seis meses, juntamente com a suplementação com o

intuito de a dieta não interferir nas análises do estresse oxidativo nos pacientes com hepatite C, durante o período de intervenção suplementar com as vitaminas C e E, e o mineral Zn.

3.1.7 Suplementação

Para a suplementação de vitamina E, C e o mineral Zn, utilizou-se como referência as quantidades sugeridas por Nathens e colaboradores (2002), as quais são baseadas na *Upper Intake Level* (UL), sendo 0,8 UL ($\cong 54 \times \text{RDA}$) para vitamina E, na forma de acetato DL- α -tocoferol (Galena Química e Farmacêutica Ltda®) e manipulado pela farmácia Fórmula Indicada®, na concentração de 800 mg/dia. Para vitamina C, 0,5 UL ($\cong 5,5 \times \text{RDA}$), na forma revestida (Pharma Nostra®) e manipulada pela farmácia Fórmula Indicada®, na concentração de 500 mg/dia. Para o mineral Zn, sendo 1 UL ($\cong 3,6 \times \text{RDA}$), na forma de zinco quelato (Pharma Nostra®) e manipulada pela farmácia Fórmula Indicada®, na concentração de 40 mg/dia. O composto suplementar final foi de 4 cápsulas ao dia, sendo prescrita 2 vezes ao dia, ou seja 2 cápsulas por horário, nos seguintes horários, 10h e 15h, intervalos das refeições, por um período de 6 meses.

3.1.8 Estratégia após seleção dos pacientes

Os pacientes incluídos no projeto seguiram os critérios de inclusão, respeitando o termo de consentimento livre esclarecido, sendo após a seleção, realizada a anamnese clínica e nutricional dos pacientes para obtenção da história clínica da doença assim como dos dados obtidos, conforme descritos anteriormente.

As defesas antioxidantes e os biomarcadores de estresse oxidativo no presente trabalho foram determinados nos 32 pacientes, sendo 12 indivíduos saudáveis, 11 pacientes com hepatite C em tratamento com interferon peguilado associado à ribavirina e 9 pacientes com hepatite C sem tratamento específico, em duas oportunidades, ou seja: a primeira determinação precedendo a terapia antioxidante e a segunda determinação após 6 meses de terapia antioxidante. A terapia antioxidante consistiu na administração de vitamina E 800 mg/dia, vitamina C 500 mg/dia e Zn 40 mg/dia, baseados na *Tolerable Upper Intake Level - Dietary*

References Intakes (NAS-UL-DRI's-2001), preconizadas pelo *Institute of Medicine* e publicada pela *National Academy Press* em 2002 (NAS-DRI's 2001). Os pacientes tiveram seu sangue coletado por uma mesma pessoa, no mesmo dia da semana e no horário entre 8 e 10 h da manhã, com o objetivo de respeitar o ciclo circadiano.

Foram coletados 15 ml de sangue pré e pós-terapia antioxidante. O material biológico, após processado (obtenção imediata de extratos ácidos e separação de plasma e eritrócitos), foi armazenado em nitrogênio líquido e usado apenas para realização dos exames propostos, sendo posteriormente desprezados. Foram observados os mesmos cuidados técnicos de coleta e conservação do material biológico até a análise laboratorial final.

3.2 Análise Estatística

Para comparações estatísticas dos marcadores de estresse oxidativo dentro dos grupos I e II, antes da intervenção com suplementação antioxidante por 6 meses, foram realizadas usando o teste *t* de Student não pareado. Para comparações estatísticas dos marcadores de estresse oxidativo no grupo II – pacientes com hepatite C sem tratamento, e no grupo III - pacientes com hepatite C em tratamento com interferon peguilado associado à ribavirina, antes e após o período de suplementação antioxidante, foi utilizado ANOVA Two-Way (duas vias), com pós-teste de Bonferroni, admitindo sempre um nível mínimo de significância de $p < 0,05$.

3.3 Considerações Éticas

Para a realização deste ensaio clínico, o presente protocolo foi encaminhado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Santa Catarina, em junho de 2007, protocolo N^o. 120/07-CEP (Anexo I). O protocolo experimental atendeu ao que determina a Resolução n^o 196/1996, do Conselho Nacional de Saúde, sobre pesquisas clínicas bem como princípios éticos, científicos e técnicos consoantes com os padrões de aceitação internacional para ensaios clínicos (normas de *Good Clinical Practice*). Cada paciente preencheu o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Apêndice II).

3.4 Protocolo Experimental

Imediatamente após a coleta de amostra sangüínea de cada indivíduo, via venosa, em tubo contendo heparina (ou sem heparina para obtenção do soro), uma alíquota de sangue foi separada e precipitada em ácido tricloroacético (TCA) 12% (1:4, v:v), sendo estocada imediatamente em nitrogênio líquido (-170°C), até a determinação da concentração de GSH. A separação dos eritrócitos e plasma, os quais foram utilizados para os ensaios dos marcadores de estresse oxidativo, foi realizada através de centrifugação rápida (3000 g durante 3 min) do sangue total, para obtenção da fração plasmática e eritrócitos. As amostras foram imediatamente estocadas em nitrogênio líquido até análise no laboratório de Ecofisiologia Respiratória, CCB, da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). Esta etapa de preparação das amostras foi realizada nos locais de coleta: Hospital Universitário de Florianópolis, da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Hospital Nereu Ramos – Pólo e na Policlínica II – Unidade Centro em Florianópolis. Este material foi enviado para o Laboratório de Ecofisiologia Respiratória da UFSC acondicionado em botijão de transporte contendo nitrogênio líquido, o que confere integridade às amostras, já que os tióis não protéicos e as enzimas antioxidantes permanecem estáveis em nitrogênio líquido por 6 meses (PALACE *et al.*, 1990).

Neste último laboratório, após a retirada do material coletado para realização das análises, os eritrócitos foram lavados 2 vezes com solução salina e depois centrifugados (5000 g por 3 min), para posteriormente sofrerem lise por sucessivos congelamentos e descongelamentos. Uma última centrifugação (5000 g, por 5 min) forneceu o sobrenadante (hemolisado) para análise dos diferentes parâmetros.

3.5 Equipamentos

As pesagens foram realizadas em balança analítica marca Ohaus® modelo AR2140. Os valores de pH foram medidos com pH-metro marca Digimed®, modelo DM20. A avaliação das defesas antioxidantes enzimáticas, conteúdos de GSH e outros marcadores de estresse oxidativo foram realizados com o auxílio de um espectrofotômetro UV-visível, duplo feixe, marca/modelo GBCUV 916 acoplado a um software apropriado e a um termostatizador eletrônico (sistema Peltier). A avaliação

da vitamina E foi realizada em aparelho HPLC SCL 10 AVP Shimadzu®, Detector SPD-M10AVP Shimadzu – Diode Array Detector®, e a vitamina C foi analisada em aparelho HPLC LC-10AD Shimadzu, Detector ESA Coulochem III (eletroquímico). A MPO foi determinada em leitor de Elisa (Organon-Tecknica, Roseland, New Jersey, EUA). As enzimas AST, ALT, GGT e ALP foram lidas no equipamento EØ : BT 3000 plus, Wiener Lab, versão 1.7.6.0/RT.

3.6 Reagentes

A enzima GR, os reagentes ácido tiobarbitúrico (TBA), ácido ascórbico, albumina, 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB), 5,5'-ditiobis-2-ácido nitrobenzóico (DTNB), D- α -tocoferol, epinefrina, nicotinamina adenina dinucleotideo fosfato na forma reduzida (NADPH), GSH, GSSG, H₂O₂ e tert-butil hidroperóxido foram adquiridos da Sigma Chemical Co. (St. Louis, USA). Todos os outros reagentes usados foram de grau analítico.

3.7 Defesas Antioxidantes e Marcadores de Estresse Oxidativo

3.7.1 Defesas antioxidantes enzimáticas

3.7.1.1 Superóxido Dismutase (SOD)

A atividade da SOD foi medida em 480 nm, de acordo com o método de Misra & Fridovich (1972), modificado por Boveris e colaboradores (1983), mediante a oxidação da adrenalina (mudança de pH 2,0 para pH 10,0), que produz o ânion superóxido e um cromóforo róseo, o adrenocromo. Quando a amostra era colocada na cubeta a enzima (SOD) presente nesta alíquota retardava sua formação. Numa cubeta contendo 1,95 ml de tampão glicina 50 mM, pH 10,2, foram adicionados 50 μ l de adrenalina 60 mM (mantida em pH em torno de 2,0, gelo e frasco âmbar para evitar a oxidação). A velocidade inicial de formação do adenocromo foi monitorada durante cerca de 100 s do início da reação, com acréscimo de absorbância a cada intervalo de 15 s em torno de 0,013-0,015 unidades, para então adicionar diferentes alíquotas da amostra, geralmente em torno de 50 a 100 μ l, dependendo da

concentração e atividade da enzima presente nesta alíquota. O tempo total de monitoramento da reação foi de 3 min. Curvas de 4 ou 5 pontos permitiram avaliar indiretamente a atividade enzimática da SOD, medidas em duplicata. Os valores, obtidos em duplicata, da SOD (U SOD mL^{-1}) foram expressos em termos de atividade da enzima, onde uma unidade arbitrária de SOD é definida como a quantidade de SOD necessária para diminuir à metade a velocidade de formação do adrenocromo (MISRA & FRIDOVICH, 1972). As amostras foram tratadas por uma mistura de clorofórmio:etanol (3:5 v:v), e em seguida por adição de água destilada; após as amostras foram agitadas vigorosamente e centrifugadas (5000 g durante 4 min) para retirar a hemoglobina presente nos lisados e impedir a geração e interferência do ânion superóxido artefactual no ensaio (MISRA & FRIDOVICH, 1972).

3.7.1.2 Catalase (CAT)

A atividade da enzima catalase foi analisada segundo Aebi (1984), que se baseia na velocidade de degradação do peróxido de hidrogênio, solução fresca de 10 mM em tampão fosfato 50 mM pH 7,0 preparada no dia da análise, onde em 2 mL desta solução em cubeta adicionou-se 20 μL do lisado e procedeu-se a leitura em 240 nm, durante 30 segundos. Todas as amostras foram analisadas em duplicatas e os valores expressos em $\text{mmol min}^{-1} \text{mL}^{-1}$. Diluições finais mínimas de 500 vezes impediram a ação peroxidativa das hemoglobinas presentes nos lisados (AEBI, 1984).

3.7.1.3 Glutathione Peroxidase (GP_x)

A enzima GP_x catalisa a redução de peróxido de hidrogênio, bem como de outros hidroperóxidos, utilizando a GSH como substrato para esta reação, produzindo GSSG (JONES *et al.*, 1981; EPP *et al.*, 1983). Para a determinação desta enzima foi utilizado o método de Flohé & Gunzler (1984) usando 10 μl de amostra e 10 μl de *tert*-butilhidroperóxido (t-BuOOH) colocados em 1 ml de um meio de reação. Este meio de reação (50 ml) é composto de 25 ml de tampão fosfato 0,1 M pH 7,0, 8,6 mg de NADPH, 10 ml de ácido dietilenotriaminopentacético (DTPA) 5 mM pH 7,0, 15 ml de água destilada, 24 mg de GSH, 3,8 μl de GR 5U e 100 μl de KCN 50

mM colocado momentos antes do ensaio. O método baseia-se em dismutar o tBuOOH pela oxidação de GSH e formação de GSSG, catalisada pela GPx. Mas a medida consiste na oxidação (diminuição da absorbância) do NADPH medido em 340 nm, já que o NADPH é utilizado na regeneração de GSH pela GR. Portanto, a velocidade de oxidação do NADPH é proporcional à velocidade de produção de GSSG a partir de GSH catalisada pela GPx presente na amostra. Os valores, obtidos em duplicata, foram expressos em $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mL}^{-1}$. O KCN adicionado ao ensaio evita a interferência do ânion superóxido no ensaio e a superavaliação da enzima devido à oxidação da hemoglobina (FLOHÉ & GUNZLER, 1984).

3.7.1.4 Glutathione Redutase (GR)

O método utilizado foi o de Calberg & Mannervick (1985), que verifica, em 340 nm, a taxa de oxidação do NADPH devido à formação de glutathione reduzida, a partir da GSSG, pela ação da GR, enzima presente na amostra, em um meio de reação (50 ml) contendo tampão fosfato 0,1 M pH 7,0; 8,6 mg de NADPH; 32,7 mg de glutathione oxidada, 10 ml de DTPA 5 mM pH 7,0 e 15 ml de água destilada. Os valores da atividade, analisadas em duplicata foram também expressos em $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mL}^{-1}$.

3.7.1.5 Glutathione S-Transferase (GST)

A atividade da GST foi medida em 340 nm, de acordo com Habig e colaboradores (1976). A amostra era adicionada a um meio contendo 10 μl de 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno 0,1 M (CDNB), 10 μl de GSH 0,1 M e 970 μl de tampão fosfato 0,1 M pH 7,0, sendo que na cubeta de referência utilizou-se 980 μl de tampão fosfato 0,1 M pH 7,0, 10 μl de 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno 0,1 M (CDNB) e 10 μl de GSH 0,1 M. Esta técnica tem como princípio o uso de 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) como substrato, para que a enzima presente na amostra conjugue a GSH ao CDNB e forme um cromóforo detectável em 340 nm, atividade esta monitorada durante 60 s. As análises foram feitas em duplicatas e os valores expressos em $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mL}^{-1}$. Lisados muito concentrados foram diluídos para

evitar densidades ópticas elevadas na cubeta, o que poderia interferir na avaliação da cinética enzimática, medidas sempre em duplicata.

3.7.2 Análise das Defesas Antioxidantes não Enzimáticas

3.7.2.1 Glutathiona Reduzida (GSH)

A concentração de GSH sanguínea foi determinada através dos tióis não protéicos, já que a GSH representa aproximadamente 95% destes tióis (BEUTLER *et al.*, 1963). Para avaliar a concentração eritrocitária de pequenos tióis em precipitado ácido (TCA 12%, 1:4, v:v), foi empregado o método de Beutler e colaboradores (1963). A adição de 0,2 ml de ácido 2-nitrobenzóico 2,5 mM (DTNB) nas cubetas contendo 1,9 ml de tampão Tris-HCL 0,2 M pH 8,0 e 0,1 ml da amostra, permitia, após cerca de 3 min e agitação da cubeta, a obtenção máxima de formação do ânion tiolato (TNB) de cor amarela, mensurável em A_{412} . Os valores foram medidos em duplicata, e expressos em $\mu\text{mol mL}^{-1}$.

3.7.2.2 Vitamina E

A determinação quantitativa da vitamina E foi realizada através de cromatografia líquida de alta pressão (HPLC), através de detecção UV, em 292 nm, segundo o método de Nicoletti e colaboradores (2001). Pipetou-se 100 μl de etanol, em um tubo com tampa, adicionou-se 100 μl do plasma, agitou-se em vortex por 10 s e adicionou-se 100 μl de hexano. Agitou-se em vortex por mais 45 s e centrifugou-se a 800 g por 5 min. Aproximadamente 75 μl do sobrenadante (fase hexano) foram transferidos para um tubo e o hexano foi evaporado em nitrogênio. Adicionou-se, então, 25 μl de dietileter e 75 μl de metanol e injetou-se 50 μl deste extrato no sistema cromatográfico. As colunas foram eluídas isocriticamente com metanol e o fluxo foi de 1 ml min^{-1} . A concentração plasmática de α -tocoferol foi determinada através de uma curva-padrão.

3.7.2.3 Vitamina C

A determinação quantitativa do ácido ascórbico foi igualmente realizada através de HPLC com detecção eletroquímica, segundo o método de Lykkesfeldt e colaboradores (1995). Como foi medido o ácido ascórbico total, foi necessário reduzir o dehidroascorbato (DHAA) presente nas amostras. Uma alíquota do plasma foi misturada com igual volume de ácido metafosfórico a 10%. Centrifugou-se a 4000 g por 10 min, em temperatura de 4 °C. Durante o ensaio as amostras foram mantidas em gelo. O ácido ascórbico total foi medido após redução do DHAA, por adição de 100 µl da amostra tratada a 50 µl de tampão Tris 0,5 M, pH 9,0, contendo dithiothreitol (DTT) 10 mM, resultando em um pH de 6,1 a 6,2, a 25°C por 5 min. Adicionou-se 50 µl de H₂SO₄ 0,2 M à amostra resfriada e 20 µl da mistura foi injetada no aparelho. Para mensuração do ácido ascórbico total (AA), 100 µl do sobrenadante da amostra foi diluída com 100 µl de tampão Tris 0,5 M, pH 9,0, resultando em um pH de 2,6 a 2,7, sendo após injetado 20 µl desta mistura no sistema cromatográfico. A fase móvel foi fosfato de hidrogênio dissódico (Na₂HPO₄) 0,1 M, EDTA 2,5 mM e cloreto de dodeciltrimetilamônio 2,0 mM, pH 3,0 ajustado com ácido orto-fosfórico, sendo filtrada através de um filtro 0,45 µm sob vácuo antes de utilizada. O fluxo foi 1,2 ml min⁻¹.

3.7.2.4 Zinco e Ferro

O conteúdo de Fe e Zn foi determinado através da técnica PIXE (*Particle Induced X-Ray Emission*), como descrito por Johansson e colaboradores (1995), junto ao Laboratório de Implantação Iônica do Instituto de Física da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. PIXE é uma importante técnica de análise baseada na emissão de raios-X induzidos por um feixe de partículas carregadas eletricamente. Usualmente, um feixe de prótons emergente de um acelerador incide na amostra a ser analisada com uma energia tipicamente entre 2 a 3 MeV. Os prótons excitam os elétrons das camadas mais internas dos átomos constituintes da amostra, ionizando-os. Como os elétrons são ejetados, gera-se então uma vacância que é preenchida por um elétron proveniente de uma outra camada eletrônica mais externa. Na transição deste elétron, pode ocorrer a emissão de raios-X característico de cada elemento presente na amostra. Os raios-X emitidos são detectados, adquiridos através de um sistema eletrônico de aquisição de dados, e

posteriormente analisados. PIXE é uma técnica de alta sensibilidade, não destrutiva, além de possibilitar o conhecimento simultâneo da composição elementar de uma amostra para elementos com $Z \geq 11$ em questão de poucos minutos.

As amostras analisadas neste trabalho com o uso de PIXE foram obtidas a partir de 3 ml de sangue total, colocados em placas de Petry e levados à estufa a 50°C. Depois de secas, as amostras foram maceradas, colocadas em tubos e reservadas em local sem luz e sem umidade. Após, as amostras foram enviadas ao Laboratório de Implantação Iônica do Instituto de Física da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, onde foram pastilhadas em *pellets* com o auxílio de uma prensa hidráulica e analisadas por PIXE.

3.7.3 Determinação dos Marcadores de Dano

3.7.3.1 Lipoperoxidação tecidual – TBARS

A avaliação da peroxidação lipídica endógena foi realizada em triplicata, através da detecção em A_{535} nm dos derivados de seus produtos de oxidação, através de substâncias que reagem com o ácido tiobarbitúrico (TBARS), destacando-se o malondialdeído, ou MDA, produzindo uma base de Schiff de coloração rosa (BIRD & DRAPER, 1984). As frações do plasma foram precipitadas com ácido tricloroacético (TCA) a 12% e agitadas vigorosamente. Em seguida, incubadas em tampão Tris-HCl 60 mM 7,4 (0,1 mM DPTA) e ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,73% durante 60 min a 100 °C. Após, o material foi resfriado durante 30 min a 5 °C e centrifugado (5 min a 10000 g) e a absorbância do cromóforo de cor rósea medida em 535 nm, sendo os valores, obtidos em triplicata, expressos em nmol ml^{-1} .

3.7.3.2 Proteína Carbonilada

O dano oxidativo a proteínas por carbonilação foi determinado pelo método proposto por Reniznick & Packer (1994). Foram adicionados 200 μL do plasma em 600 μL de DPNH (2,4-dinitro fenil hidrazina). Incubou-se por 1 hora à temperatura ambiente no escuro, com agitação a cada 15 min. Adicionou-se 600 μL de TCA 20

%, agitou-se em agitador de tubos, manteve-se em banho de gelo por 10 min e em seguida centrifugou-se por 5 min a 5000 *g*. Foram adicionados 800 μL de etanol-acetato de etila, com agitação seguinte e centrifugação por 5 min a 14000 *g*, procedimento que foi repetido por 3 vezes, utilizando o pellet. Ao final, o excesso de etanol-acetato de etila foi retirado com auxílio de um cotonete, adicionaram-se 600 μL de guanidina, manteve-se em banho-maria a 37 °C por 10 min e procedeu-se à leitura a 360 nm. A concentração de proteínas totais foi determinada segundo o método de Lowry, usando como padrão a albumina. A concentração de proteína carbonilada foi expressa em nmol mg^{-1} .

3.7.3.3 Aspartato Aminotransferase – AST

As amostras de soro foram coletadas e conservadas em nitrogênio líquido até envio ao Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Universitário de Florianópolis para realização das leituras. Durante o experimento as mesmas foram mantidas em temperatura entre 2-8 °C. A leitura das amostras foi realizada no equipamento EØ : BT 3000 plus, Wiener Lab, versão 1.7.6.0/RT, por método cinético (GELLA *et al.*, 1985; IFCC, 1986), através de Kit da Siemens®.

A AST catalisa a transferência reversível do grupamento amino do L-aspartato para o 2-oxaloglutarato, liberando oxaloacetato e L-glutamato. O oxaloacetato é reduzido pela NADH, reação catalisada pela malato desidrogenase, liberando L-malato e NAD^+ , sendo a transformação da NADH por oxidação à NAD^+ monitorada em 340 nm. A conseqüente redução da absorbância em 340 nm, monitorizada espectrofotometricamente, é diretamente proporcional à atividade da enzima na amostra.

Preparou-se o reagente de trabalho misturando 4 volumes de tampão TRIS pH 7,8 (a 30 °C) contendo L-aspartato com 1 volume de substrato (2-oxaloglutarato, nicotinamida-adenina dinucleotido reduzido – NADH, malato desidrogenase e lactato desidrogenase), e manteve-se o reagente de à temperatura de 37°C em banho-maria. Pipetou-se na cubeta 1000 μL do reagente de trabalho e 100 μL da amostra, anotando-se a absorbância inicial e o cronômetro foi acionado simultaneamente. Foram feitas novas leituras a cada minuto, após exatamente 1, 2 e 3 min, sendo que as diferenças entre absorbâncias ($\Delta A \text{ min}^{-1}$) devem ser praticamente iguais,

indicando a linearidade do método. O aumento médio de absorvância por minuto ($\Delta A \text{ min}^{-1}$) foi medido em 340 nm e a concentração expressa em U L^{-1} .

3.7.3.4 Alanina Aminotransferase – ALT

As amostras de soro foram coletadas e conservadas em nitrogênio líquido até envio ao Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Universitário de Florianópolis para realização das leituras. Durante o experimento as mesmas foram mantidas em temperatura entre 2-8 °C. A leitura das amostras foi realizada no equipamento EØ : BT 3000 plus, Wiener Lab, versão 1.7.6.0/RT, por método cinético (Bergmeyer *et al.*, 1985; IFCC, 1986), através de Kit da Siemens®.

A ALT catalisa a transferência reversível do grupamento amino da L- alanina para o 2-oxaloglutarato, liberando piruvato e L-glutamato. O piruvato é reduzido pela NADH, reação catalisada pela lactato desidrogenase, liberando L-lactato e NAD^+ , sendo a transformação da NADH por oxidação à NAD^+ monitorada em 340 nm. A conseqüente redução da absorvância em 340 nm, monitorizada espectrofotometricamente, é diretamente proporcional à atividade da enzima na amostra.

Preparou-se o reagente de trabalho misturando 4 volumes de tampão TRIS pH 7,8 (a 30 °C) contendo L-alanina com 1 volume de substrato (2-oxaloglutarato, nicotinamida-adenina dinucleotido reduzido – NADH e lactato desidrogenase), e manteve-se o reagente à temperatura de 37 °C em banho-maria. Pipetou-se na cubeta 1000 μL do reagente de trabalho e 100 μL da amostra, anotando-se a absorvância inicial e o cronômetro foi acionado simultaneamente. Foram feitas novas leituras a cada minuto, após exatamente 1, 2 e 3 min, sendo que as diferenças entre absorvâncias ($\Delta A \text{ min}^{-1}$) devem ser praticamente iguais, indicando a linearidade do método. O aumento médio de absorvância por minuto ($\Delta A \text{ min}^{-1}$) foi medido em 340 nm e a concentração expressa em U L^{-1} .

3.7.3.5 Fosfatase Alcalina – ALP

As amostras de soro foram coletadas e conservadas em nitrogênio líquido até envio ao Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Universitário de Florianópolis

para realização das leituras. Durante o experimento as mesmas foram mantidas em temperatura entre 2-8 °C. A leitura das amostras foi realizada no equipamento EØ : BT 3000 plus, Wiener Lab, versão 1.7.6.0/RT, por método cinético-otimizado (Bowers & McComb, 1966), através de Kit da Siemens®.

A ALP hidrolisa o p-nitrofenilfosfato (p-NFF), que não tem cor, produzindo fosfato e p-nitrofenol a pH alcalino. A velocidade de surgimento do ânion p-nitrofenolato (amarelo) a 405 nm, é proporcional à atividade enzimática da amostra. A dietanolamina (DEA), regula o pH da reação e atua como receptor do fosfato liberado pela fosfatase (transfosforilação), observando-se como resultado uma aceleração da reação.

Preparou-se o reagente de trabalho misturando 4 volumes de tampão DEA contendo cloreto de magnésio com 1 volume de substrato (p-nitrofenilfosfato), e manteve-se o reagente de à temperatura de 37 °C em banho-maria. Pipetou-se na cubeta 1000 µL do reagente de trabalho e 10 µL da amostra, esperando-se 20 s e anotando-se a absorbância inicial, o cronômetro foi acionado simultaneamente. Foram feitas novas leituras a cada minuto, após exatamente 1, 2 e 3 min, sendo que as diferenças entre absorbâncias ($\Delta A \text{ min}^{-1}$) devem ser praticamente iguais, indicando a linearidade do método. O aumento médio de absorbância por minuto ($\Delta A \text{ min}^{-1}$) foi medido em 405 nm e a concentração expressa em $U L^{-1}$.

3.7.3.6 Gama-glutamyltransferase (GGT)

As amostras de soro foram coletadas e conservadas em nitrogênio líquido até envio ao Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Universitário de Florianópolis para realização das leituras. Durante o experimento as mesmas foram mantidas em temperatura entre 2-8 °C. A leitura das amostras foi realizada no equipamento EØ : BT 3000 plus, Wiener Lab, versão 1.7.6.0/RT, por método cinético-colorimétrico (Schumann *et al.*, 2002), através de Kit da Siemens®.

A GGT catalisa a transferência do grupamento γ -glutamil da γ -glutamil-3-carboxi-4-nitroanilida para a glicilglicina, liberando γ -glutamilglicilglicina e 3-carboxi-4-nitroanilina. A 3-carboxi-4-nitroanilina apresenta elevada absorção em 405 ou 410 nm e a quantidade liberada é diretamente proporcional à atividade da GGT na amostra (IFCC Methods, 2004). Preparou-se o reagente de trabalho misturando 4

volumes de tampão (glicilglicina 206,25 mmol L⁻¹, hidróxido de sódio 130 mmol L⁻¹, pH 7,9) com 1 volume de substrato (γ -glutamil-3-carboxi-4-nitroanilida 32,5 mmol L⁻¹), e manteve-se o reagente de à temperatura de 37°C em banho-maria. Pipetou-se na cubeta 1000 μ L do reagente de trabalho e 100 μ L da amostra, anotando-se a absorbância inicial e o cronômetro foi acionado simultaneamente. Foram feitas novas leituras a cada minuto, após exatamente 1,2 e 3 min, sendo que as diferenças entre absorbâncias ($\Delta A \text{ min}^{-1}$) devem ser praticamente iguais, indicando a linearidade do método. O aumento médio de absorbância por minuto ($\Delta A \text{ min}^{-1}$) foi medido em 405 nm e a concentração expressa em U L⁻¹.

3.7.4 Determinação da Mieloperoxidase

As amostras de soro foram coletadas e armazenadas em nitrogênio líquido. Nos dias dos experimentos, as amostras foram descongeladas em temperatura ambiente. Volumes de 40 μ L da amostra ou do padrão (MPO de neutrófilos humanos 0,7-140 mU mL⁻¹) foram transferidos para cubetas e a reação bioquímica iniciada com a adição de 360 μ L de meio tampão (0,167 mg mL⁻¹ de o-dianisidina 2HCl, 0,1 ml de H₂O₂ 30%, H₂O destilada e NaH₂PO₄ 50 mM). Após 15 min de incubação à temperatura ambiente, a reação enzimática foi interrompida com a adição de 30 μ L de azida sódica 1% (Rao *et al*, 1993). A seguir, as amostras foram centrifugadas (5000 g, por 5 min), e o sobrenadante transferido para cubetas, para posterior leitura das densidades óticas a 450 nm em leitor de Elisa (Organon-Tecknica, Roseland, New Jersey, EUA). Curvas-padrão com concentrações conhecidas da MPO (0,7-140 mU mL⁻¹) também tiveram suas densidades óticas determinadas, permitindo a quantificação dos valores desconhecidos. Os valores da MPO foram expressos em mU mL⁻¹, com o auxílio da equação de reta.

4 RESULTADOS

4.1 Avaliação do Consumo Alimentar

Na análise do consumo alimentar, os macronutrientes (carboidratos, lipídios e proteínas) ficaram acima do recomendado pela RDA–DRI's (NAS, 2001). No entanto, quando calculamos a energia consumida por dia, referente aos macronutrientes, observamos que a mesma ficou abaixo do recomendado em média pela RDA–DRI's (NAS, 2001) em ambos os sexos. Considerando os micronutrientes, vitaminas E e C e o mineral Zn, observamos que a ingestão diária de vitamina C encontra-se adequada em ambos os grupos e sexos, já a vitamina E ficou abaixo da referência segundo a RDA–DRI's (NAS, 2001) (55,5% - GII e 59,93% - GIII). Quanto a ingestão diária de Zn, apenas o sexo masculino do GII e o sexo feminino do GIII ficaram abaixo das recomendações conforme a RDA–DRI's (NAS, 2001).

Tabela 03 – Comparação entre os grupos controle positivo – GII e grupo experimental – GIII em relação ao consumo alimentar e as RDA-DRI's (NAS, 2001).

	DRI's	Grupo II - Controle Positivo	Grupo III – Experimental
Energia (kcal/dia)	M – 2349 F - 1982	M – 1919,82±302,50 F – 1569,26±273,80	M – 1861,35±150,80 F – 1260,20±385,95
Carboidrato (g/dia)	130	254,02±19,50	235,75±14,70
Proteína (g/dia)	M – 56 F - 46	M – 72,09±13,90 F – 58,16±20,8	M – 93,98±13,37 F – 44,86±21,33
Lipídio (g/dia)	20-35	58,53±7,52	53,43±5,48
Vit. C (mg/dia)	M-90 F - 75	M – 92,10±49,70 F – 108,52±51,02	M – 150,2±40,13 F – 132,60±127,90
Vit. E (mg/dia)	15	6.68±3.69	6.01±2.15
Zn (mg/dia)	M-11 F - 8	M – 9,62±2,13 F – 8,46±3,26	M – 10,80±1,14 F – 4,50±3,26

Resultados expressos em média ± erro padrão. Considerando F – sexo feminino e M – sexo masculino.

4.2 Determinação das Defesas Antioxidantes Enzimáticas

4.2.1 Atividade da SOD

A SOD (figura 13), apresentou diferença significativa entre os grupos I e II ($p < 0,001$), segundo o teste t de Student não pareado, nas determinações iniciais. Conforme análise da ANOVA em duas vias seguida do pós-teste de Bonferroni, entre os grupos II e III antes da suplementação antioxidante, houve diferença significativa ($p < 0,05$). Após a suplementação por 6 meses, não apresentou nenhuma alteração significativa nos grupos II e III ($p = 0,16$; $0,21$; respectivamente), embora tenha sido observada uma tendência de aumento no grupo II e uma tendência de diminuição no grupo III.

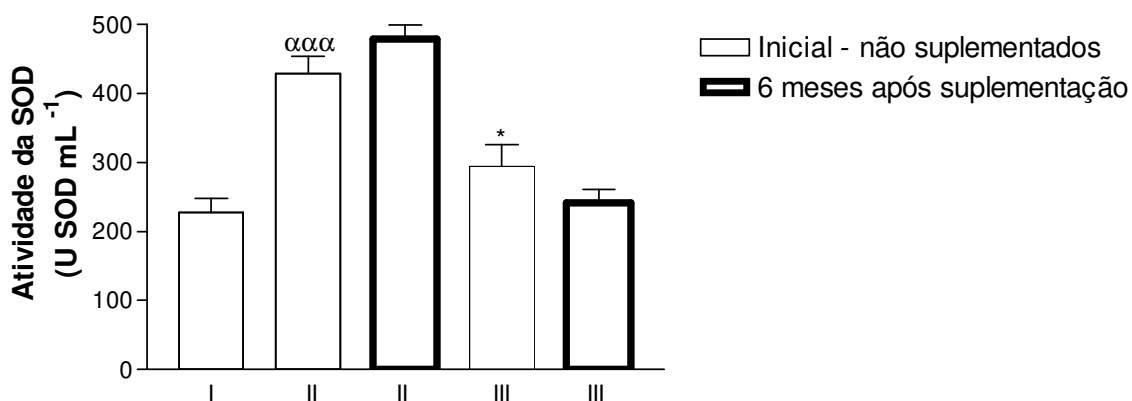
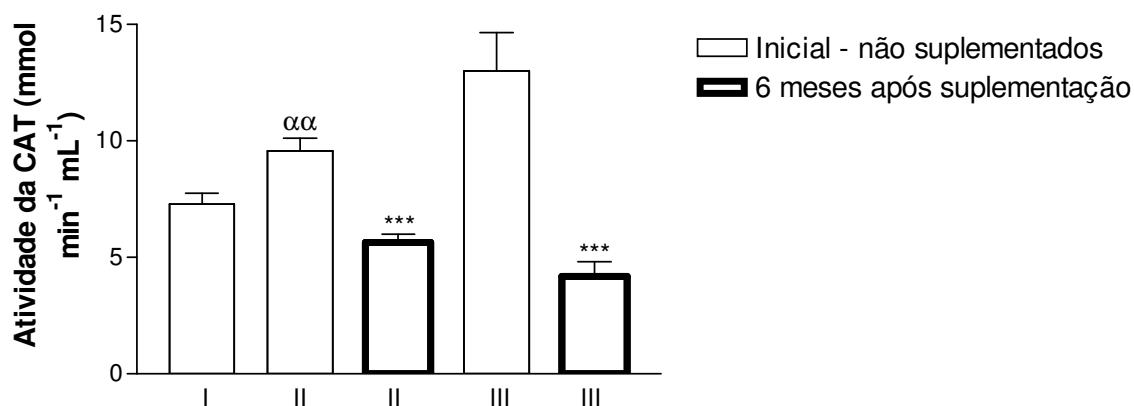


Figura 13 – Atividade da Superóxido dismutase (SOD) no sangue de indivíduos saudáveis-banco de sangue (Grupo I; n=12) e pacientes com hepatite C sem tratamento específico (Grupo II; n=9), e em tratamento com interferon associado à ribavirina (Grupo III; n=11), no intervalo de 6 meses, antes e após a administração de vitamina E, vitamina C e o mineral Zn. Os resultados representam a média ± erro padrão. Teste t de Student não pareado para comparação dos grupos II e III antes da suplementação. ANOVA de duas vias seguida pelo teste de Bonferroni entre a determinação inicial e após 6 meses de suplementação antioxidante nos grupos II e III. A diferença estatística pelo teste t de Student não pareado foi simbolizada pela letra grega α em cima da barra dos gráficos e a diferença estatística pela ANOVA de duas vias foi simbolizada pelo asterisco em cima da barra, sendo α ; * $p < 0,05$; $\alpha\alpha$; ** $p < 0,01$; $\alpha\alpha\alpha$; *** $p < 0,001$.

4.2.2 Atividade da CAT

A atividade enzimática da CAT (figura 14), considerando o teste t de Student não pareado entre os grupos I e II nas determinações iniciais, apresentou diferença estatística com $p < 0,01$. Conforme análise da ANOVA de duas vias seguida do teste de Bonferroni, após a suplementação por 6 meses, os grupos II e III apresentaram alteração significativa, com $p < 0,001$ em ambos os grupos.



13. **Figura 14 – Atividade da Catalase (CAT) no sangue (lisados).** Detalhes semelhantes aos da figura 13.

4.2.3 Atividade da GPx

A atividade da GPx (figura 15), apresentou perfil semelhante ao da SOD (Figura 07). No entanto, segundo o teste t de Student não pareado, não houve alteração significativa entre os grupos I e II nas determinações iniciais, embora tenha sido observada uma tendência de aumento. Já após 6 meses de suplementação antioxidante, houve um aumento significativo no grupo II ($p < 0,05$) e uma diminuição significativa na atividade da glutathiona peroxidase no grupo III ($p < 0,05$).

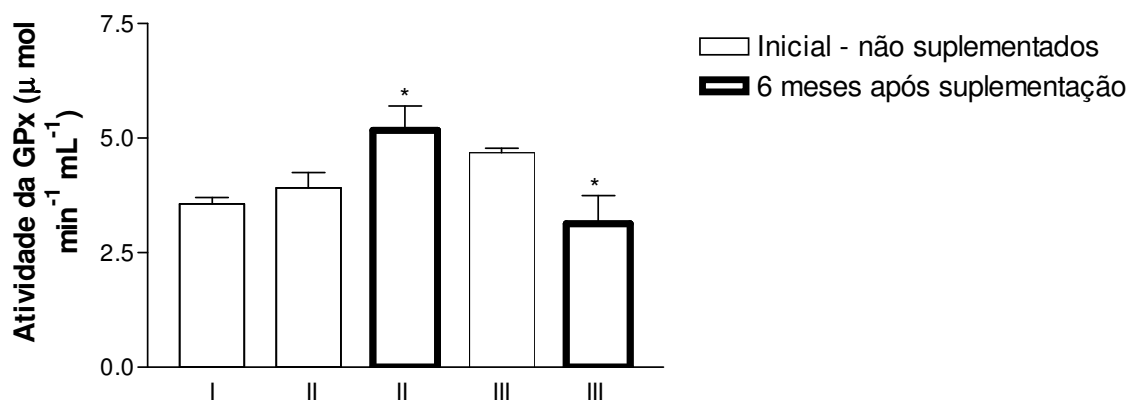


Figura 15 – Atividade da Glutathiona peroxidase (GPx) no sangue (lisados). Detalhes semelhantes aos da figura 13.

4.2.4 Atividade da GR

A atividade da GR (figura 16), considerando as determinações iniciais, apresentou diminuição significativa entre os grupos I e II ($p < 0,01$), de acordo com o

teste *t* de Student não pareado. Segundo análise da ANOVA de duas vias, seguida do pós-teste de Bonferroni, entre os grupos II e III antes da suplementação antioxidante houve diferença significativa ($p < 0,001$), já após a suplementação por 6 meses, apenas o grupo III apresentou uma diminuição significativa ($p < 0,001$), permanecendo inalterada a atividade da glutatona redutase no grupo II.

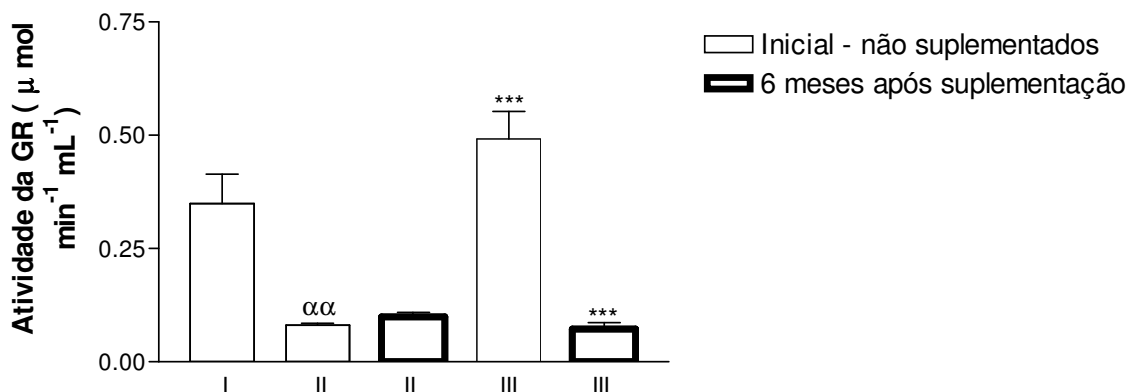


Figura 16 – Atividade da Glutaciona redutase (GR) no sangue (lisados). Detalhes semelhantes aos da figura 13.

4.2.5 Atividade da GST

Considerando as determinações iniciais da atividade da GST (figura 17), não foi observada alteração significativa entre os grupos I e II, segundo o teste *t* de Student não pareado. No entanto quando aplicado análise da ANOVA de duas vias seguida do pós-teste de Bonferroni, antes da suplementação antioxidante observou-se um aumento significativo entre os grupos II e III ($p < 0,001$), mostrando um aumento da atividade da GST nos pacientes com hepatite C em tratamento com interferon associado à ribavirina. Já após 6 meses de suplementação antioxidante, a GST mostrou uma atividade diminuída em ambos os grupos suplementados ($p < 0,001$).

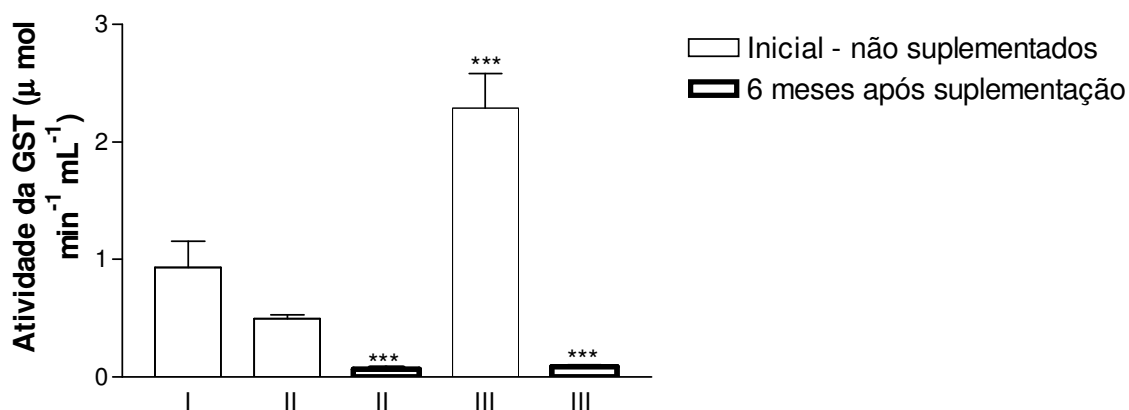


Figura 17 – Atividade da Glutathione S-transferase (GST) no sangue (lisados). Detalhes semelhantes aos da figura 13.

4.3 Determinação das Defesas Antioxidantes não Enzimáticas

4.3.1 Glutathione Reduzida (GSH)

Quanto às concentrações sanguíneas de GSH (figura 18), considerando as determinações iniciais, não houve alteração significativa entre os grupos I e II segundo o teste t de Student não pareado, embora tenha sido observada uma tendência de diminuição na concentração de glutathione reduzida. Após 6 meses de suplementação com vitaminas E e C, e o mineral Zn, houve um aumento significativo nas concentrações de GSH nos grupos II e III, com $p < 0,05$ e $p < 0,001$, respectivamente, após aplicar análise da ANOVA de duas vias seguida do teste de Bonferroni.

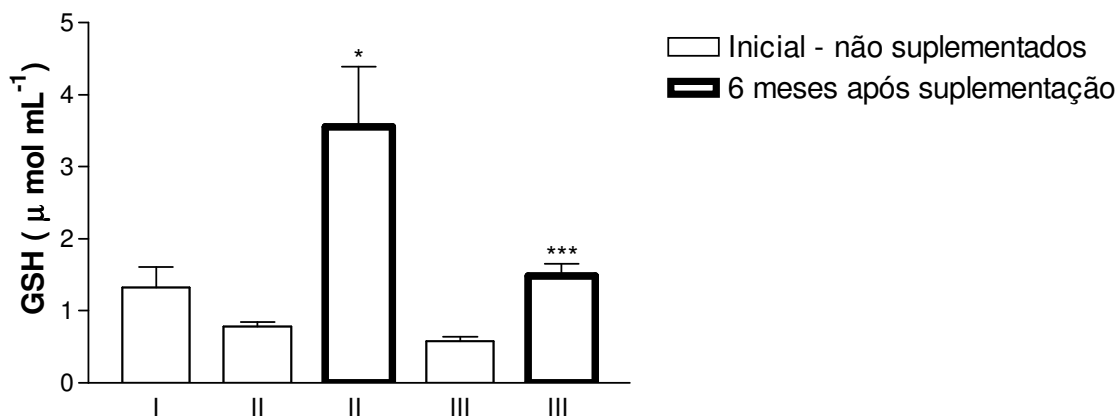


Figura 18 – Concentração de Glutathione reduzida (GSH) no extrato ácido do sangue total. Detalhes semelhantes aos da figura 13.

4.3.2 Vitamina E

Nas determinações iniciais, a concentração plasmática de vitamina E apresentou uma diminuição significativa, segundo o teste *t* de Student não pareado, entre os grupos I e II ($p < 0,001$). Considerando as determinações antes da suplementação antioxidantes, quando aplicada a análise da ANOVA de duas vias seguida do pós-teste de Bonferroni, foi observado um aumento significativo da concentração plasmática de vitamina E nos pacientes com hepatite C em tratamento com interferon associado à ribavirina (grupo III), quando comparado aos pacientes com hepatite C não tratados (grupo II) ($p < 0,001$). Já após 6 meses de suplementação com vitaminas E, C e o mineral Zn, foi observada uma depleção significativa da concentração plasmática de vitamina E no grupo III ($p < 0,001$).

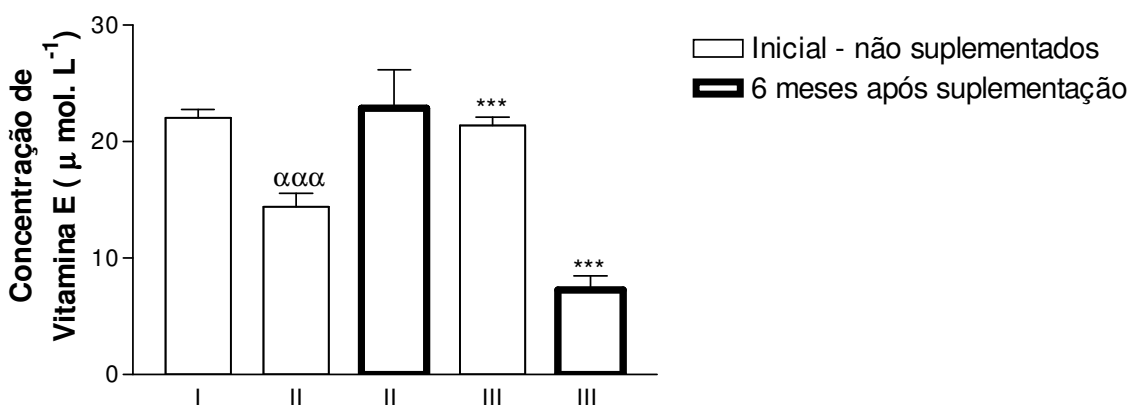


Figura 19 – Concentração de vitamina E no plasma. Detalhes semelhantes aos da figura 13.

4.3.3 Vitamina C

As determinações de vitamina C plasmática nos pacientes não permitiram sua inclusão no presente trabalho, provavelmente em decorrência de problemas metodológicos, além de problemas ocorridos no instrumento HPLC (filtro) durante a sua detecção.

4.3.4 Zinco

A concentração de Zn (figura 20) nas determinações iniciais entre os grupos I e II não apresentou alteração significativa, quando aplicado o teste *t* de Student não pareado. Também não foi encontrada nenhuma alteração significativa após

suplementação antioxidante por 6 meses nos grupo II e III ($p=0,8039$; $p=0,6679$, respectivamente), segundo análise da ANOVA de duas vias seguida do pós-teste de Bonferroni.

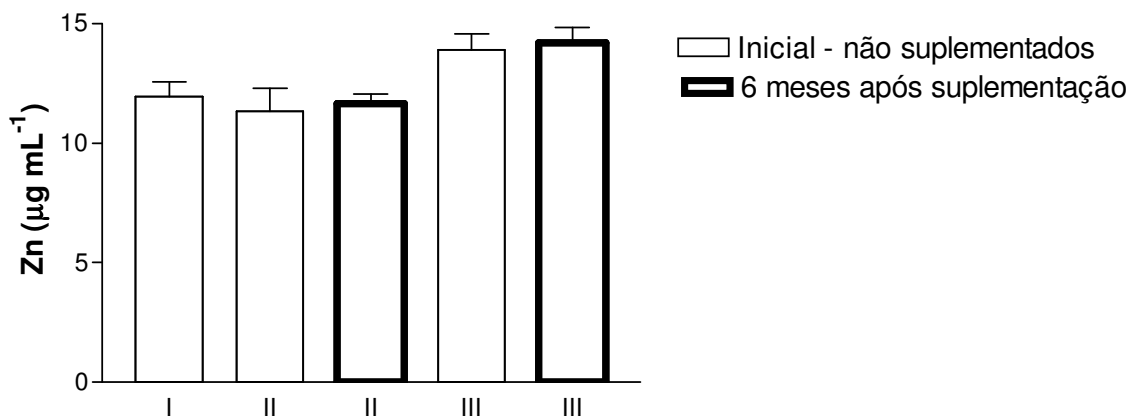


Figura 20 – Concentração de Zn no sangue. Detalhes semelhantes aos da figura 13.

4.3.5. Ferro

Considerando as determinações iniciais, não foi observada nenhuma alteração significativa na concentração de Fe (figura 21) entre os grupos I e II, segundo teste t de Student não pareado. Da mesma forma, após 6 meses de suplementação com vitaminas E, C e o mineral Zn, não foram encontrados nenhuma alteração significativa nos grupos II e III ($p=0,0601$; $p=0,0962$, respectivamente), quando aplicado análise da ANOVA de duas vias seguida do pós-teste de Bonferroni.

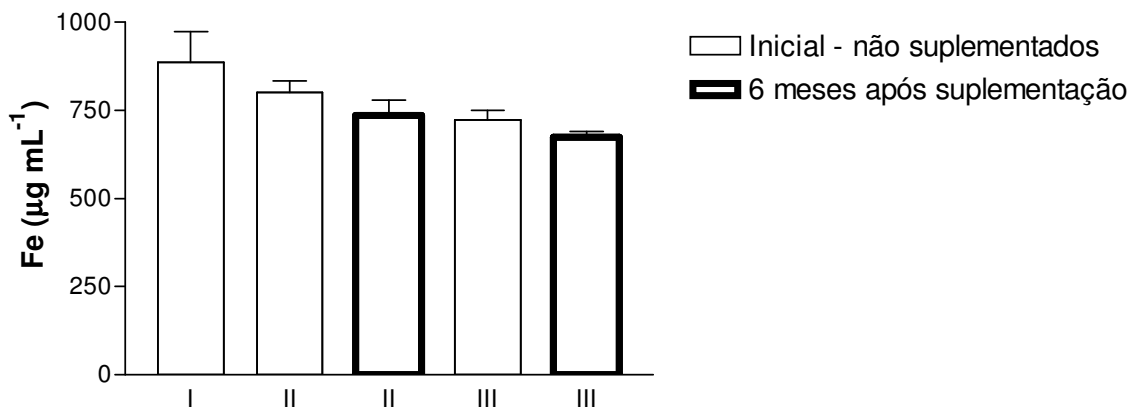


Figura 21 – Concentração de Fe no sangue. Detalhes semelhantes aos da figura 13.

4.4 Determinação dos Marcadores de Dano

4.4.1 TBARS (Lipoperoxidação)

Considerando a concentração plasmática de TBARS (figura 22) entre os grupos I e II, antes da suplementação antioxidante, não foi encontrada nenhuma alteração significativa, quando aplicado o teste *t* de Student não pareado. No entanto, após a suplementação antioxidante, foi detectada uma diminuição estatisticamente significativa apenas no grupo II, segundo análise da ANOVA de duas vias seguida do pós-teste de Bonferroni ($p < 0,01$).

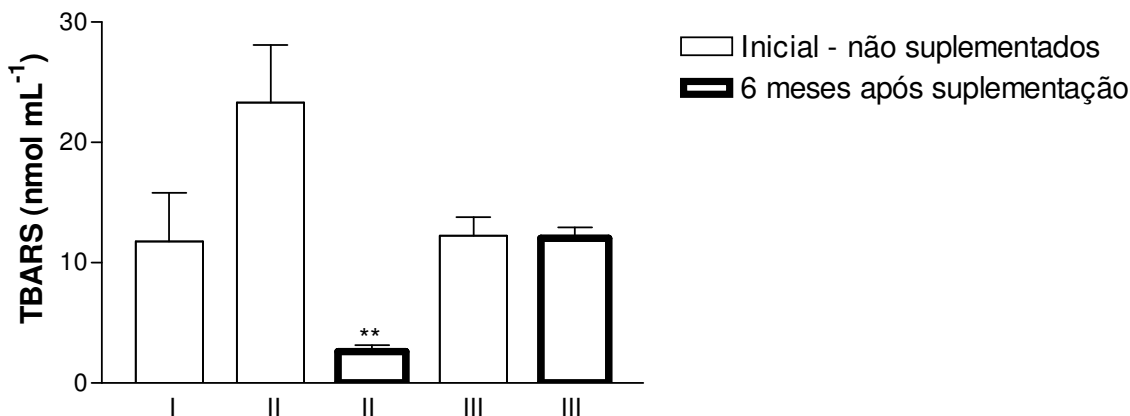
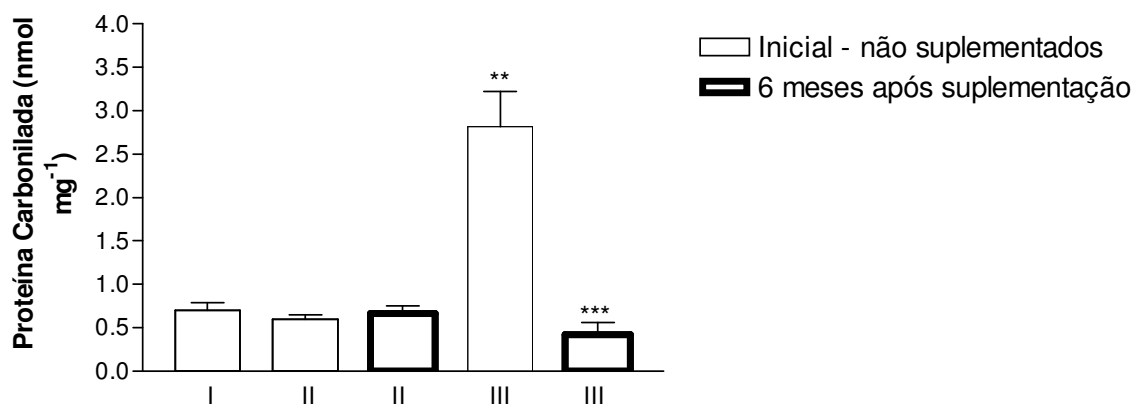


Figura 22 – Concentração de substâncias que reagem com o ácido tiobarbitúrico TBARS no plasma. Detalhes semelhantes aos da figura 13.

4.4.2 PC (Proteína Carbonilada)

Considerando os conteúdos de PC (figura 23) antes da suplementação antioxidante entre os grupos I e II, não foi observada nenhuma alteração significativa, segundo o teste *t* de Student não pareado. Já, quando aplicado análise da ANOVA de duas vias seguida do pós-teste de Bonferroni, antes da suplementação por 6 meses, foi observado um aumento significativo no grupo III ($p < 0,01$), quando comparado ao grupo II; e após a suplementação antioxidante, foi observada uma forte diminuição na concentração de proteína carbonilada no grupo III ($p < 0,001$).



13. **Figura 23 – Concentração de proteína carbonilada no plasma.** Detalhes semelhantes aos da figura

4.4.3 AST

Não houve alterações significativas na concentração da AST (figura 24) entre os grupos I e II, quando aplicado o teste *t* de Student não pareado ($p=0,8584$). Após a suplementação com vitaminas E, C e o mineral zinco durante 6 meses, também não apresentou diferença estatisticamente significativa, nos grupo II e III, conforme análise da ANOVA de duas vias seguida do teste de Bonferroni.

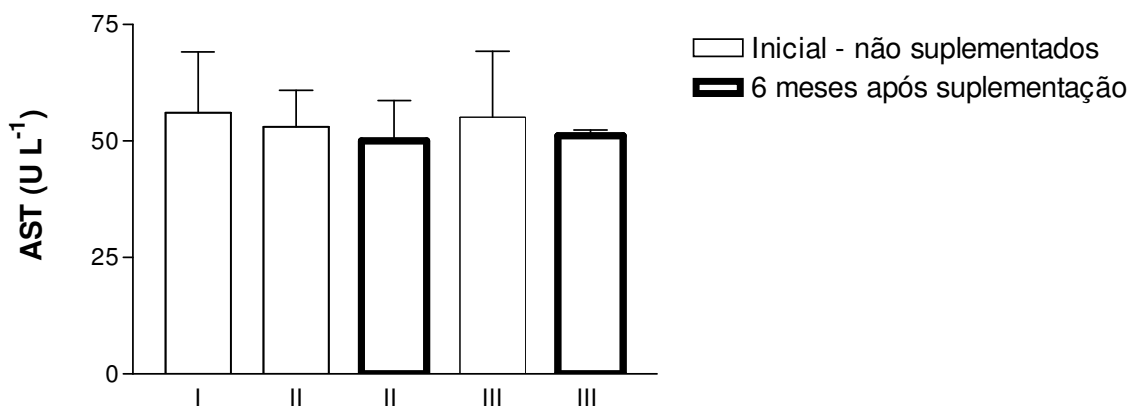


Figura 24 – Concentração da AST no soro. Detalhes semelhantes aos da figura 13.

4.4.4 ALT

A concentração de ALT (figura 25) nas determinações iniciais, apresentou um aumento significativo entre os grupos I e II ($p<0,001$), quando aplicado o teste *t* de Student não pareado. Após a suplementação antioxidante, não houve diferença

estatística nos grupos II e III ($p=0,4907$ e $p=0,0958$, respectivamente), conforme análise da ANOVA de duas vias seguida do pós-teste de Bonferroni.

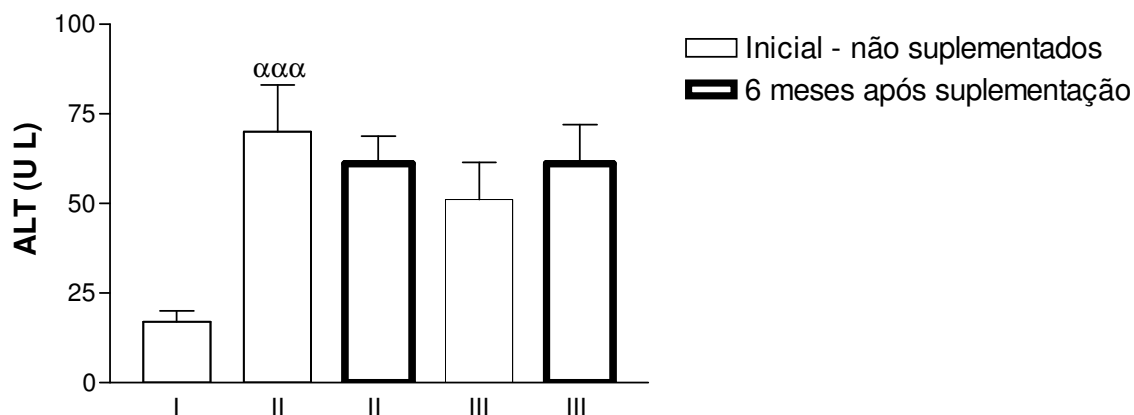


Figura 25 – Concentração da ALT no soro. Detalhes semelhantes aos da figura 13.

4.4.5 ALP

Considerando a determinação inicial da atividade da fosfatase alcalina (figura 26) nos grupos I e II, verificou-se uma diminuição significativa no grupo II em relação ao grupo I ($p<0,001$). Foi observado também um aumento estatisticamente significativo na atividade da ALP no grupo III quando comparado ao grupo II, conforme análise da ANOVA de duas vias seguida pelo teste de Bonferroni. Após 6 meses de suplementação antioxidante, verificou-se uma diminuição significativa no grupo III, com valor de $p<0,001$.

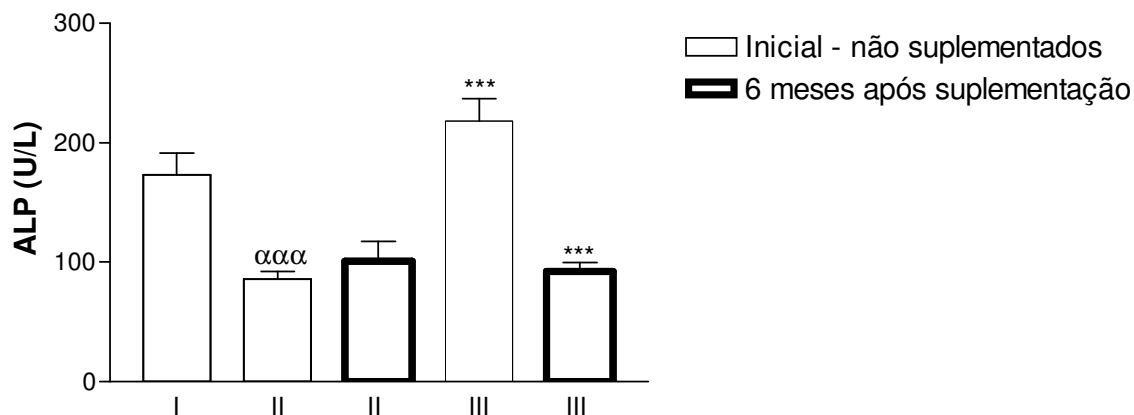


Figura 26 – Concentração da ALP no soro. Detalhes semelhantes aos da figura 13.

4.4.6 GGT

Não houve alterações significativas na atividade da GGT (figura 27) entre os grupos I e II, considerando as determinações iniciais ($p=0,1897$), quando aplicado o teste t de Student não pareado. Comparando os grupos II e III, antes e após a suplementação antioxidante, verificou-se também que não houve diferenças estatísticas, com $p=0,3765$ e $p=0,1040$, respectivamente, conforme análise da ANOVA de duas vias seguida do teste de Bonferroni.

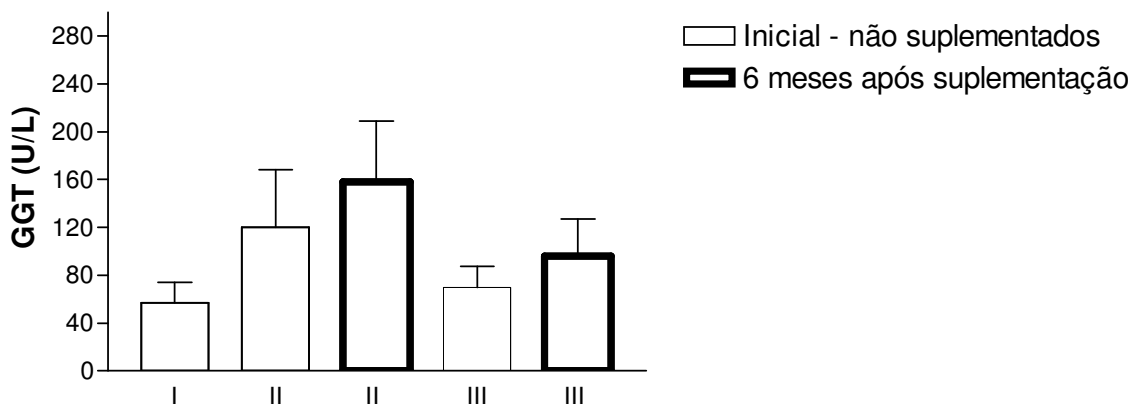


Figura 27 – Concentração da GGT no soro. Detalhes semelhantes aos da figura 13.

4.5 MPO

Nas determinações iniciais, não foi detectada nenhuma alteração significativa na atividade da MPO (figura 28) entre os grupos I e II, quando aplicado o teste t de Student não pareado. Considerando a intervenção com suplementação antioxidante durante 6 meses, foi detectado um aumento significativo na atividade da mieloperoxidase no grupo II ($p<0,05$), enquanto que no grupo III não houve nenhuma alteração significativa, quando aplicada análise da ANOVA de duas vias seguida do teste de Bonferroni ($p=0,3726$).

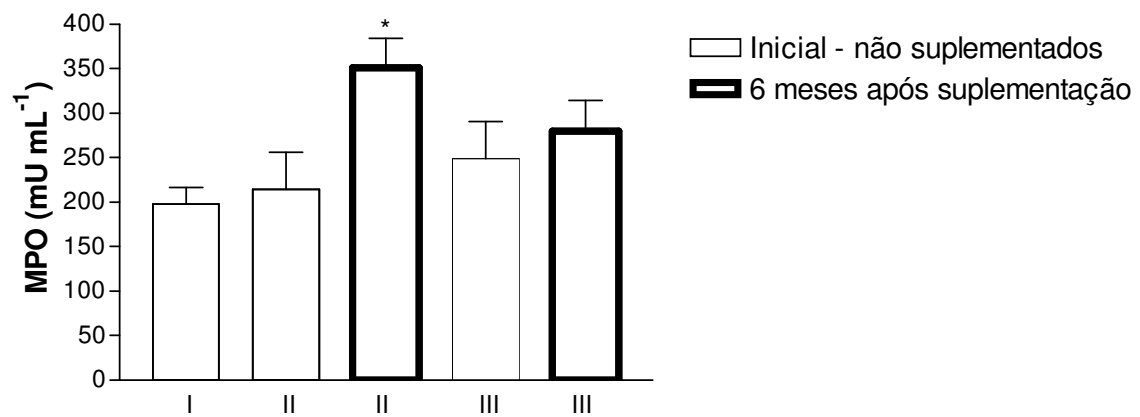


Figura 28 – Atividade de mieloperoxidase no soro. Detalhes semelhantes aos da figura 13.

5 DISCUSSÃO

Analisando a caracterização das amostras quanto à distribuição dos genótipos nos pacientes com VHC, observou-se uma predominância do genótipo tipo 1, corroborando estudo de Campiotto e colaboradores (2005), onde demonstraram que no Brasil, o genótipo tipo 1 é predominante em todos os estados. Quanto ao consumo alimentar dos grupos II (controle positivo) e grupo III (experimental), verificou-se que ambos os grupos apresentaram consumo acima do adequado de carboidratos, proteínas, lipídios. No entanto, ao considerarmos a ingestão de Zn, no sexo masculino (GII) e sexo feminino (GIII) e vitamina E, em ambos os sexos e grupos, observou-se um baixo consumo em relação à RDA-DRI's (NAS, 2001). Embora o consumo de vitamina C, em ambos os grupos e sexos, tenha sido adequado em relação às necessidades diárias conforme a RDA-DRI's (NAS, 2001), a suplementação de vitaminas e minerais, por sua vez, está preconizada em determinadas patologias, como hepatite C, não excedendo às quantidades toleráveis (UL) recomendadas pelo Conselho Nacional de Pesquisa dos EUA – *Recommended Dietary Allowances* (RDA) (SILVA & NAVES, 2001).

No presente trabalho a SOD, na determinação anterior à suplementação antioxidante, segundo o teste *t* não pareado, apresentou aumento significativo (88,3% - $p < 0,001$) entre o grupo I e grupo II, o que poderia estar refletindo uma necessidade inicial das defesas antioxidantes manterem-se elevadas, no sentido de tentar combater a agressão oxidativa causada pela presença do vírus da hepatite C. Entre o grupo II (controle positivo) e grupo III (grupo experimental), foi observada uma diminuição estatisticamente significativa (31,3%) na atividade da SOD, o que não condiz com estudo de Levent e colaboradores (2006), que em estudo semelhante, mostraram que, após o tratamento com interferon associado à ribavirina, houve um aumento da atividade da SOD nos pacientes tratados quando comparados aos não tratados. Considerando 6 meses de intervenção com terapia antioxidante, foi observada no grupo III, embora não significativa, uma tendência de diminuição (18,1%) na atividade da SOD, no sentido de normalizar esta atividade após a intervenção com a suplementação, relativamente ao controle negativo. Esta resposta teve um perfil semelhante ao verificado na atividade da CAT após suplementação. Entretanto, a atividade da SOD no grupo II após a suplementação antioxidante, não apresentou uma diminuição, permanecendo inalterada.

A atividade da SOD, a qual havia aumentado antes da suplementação antioxidante, o que poderia refletir uma necessidade compensatória perante a geração de EROs promovida pela presença do vírus da hepatite C, após a suplementação antioxidante foi normalizada em valores próximos àqueles apresentados pelos controles. De modo análogo, Rousselot e colaboradores (2006) encontraram um aumento da atividade da SOD entre indivíduos sem doença hepática alcoólica e em pacientes infectados com hepatite B, C e delta. De modo semelhante, Boya e colaboradores (1999) e também Ko e colaboradores (2005), em estudos envolvendo pacientes com hepatite C crônica e indivíduos saudáveis, mostraram igualmente aumento da atividade da superóxido dismutase.

Considerando a determinação inicial, a atividade da CAT entre o grupo I – banco de sangue (controle negativo) e o grupo II – pacientes com hepatite C sem tratamento específico (controle positivo), apresentou um aumento significativo (31,2%; $p < 0,01$) da sua atividade, provavelmente ocasionado pelo aumento de geração de EROs relacionado com a presença do VHC. Entre os grupos II e III, controle positivo e o grupo experimental, a atividade da CAT não apresentou alterações significativas, porém observou-se uma tendência de aumento (36,1%), sugerindo que, além do próprio vírus da hepatite C promover o aumento de EROs, a terapia utilizada para o tratamento de hepatite C crônica poderia estar interferindo nas defesas antioxidantes.

Após a suplementação antioxidante, a CAT mostrou forte diminuição de sua atividade nos grupos II e III (41,2% e 67,8%, respectivamente), novamente sugerindo a ação antioxidante da suplementação, que, além de provavelmente neutralizar a geração de EROs promovidas pelo VHC, permitiu diminuir a atividade desta enzima comparativamente ao grupo controle negativo. O aumento da atividade da CAT foi constatado também em células hepáticas infectadas pelo vírus HCV, sugerindo uma adaptação ao estresse oxidativo já descrita em outros trabalhos (ABDALLA *et al.*, 2005; QADRI *et al.*, 2004). Como a vitamina E é considerada o principal antioxidante protetor da lipoperoxidação, a mesma poderia estar seqüestrando radicais peróxil (RO_2^{\bullet}), formados durante o ataque do H_2O_2 e outras EROs às membranas lipídicas, conseqüentemente diminuindo a atividade da catalase.

Nas determinações iniciais, a GPx não apresentou diferenças significativas entre o grupo I e II, embora tenha sido observada uma tendência de aumento (9,7%) na atividade da GPx, sugerindo aumento das defesas antioxidantes perante o

aumento de EROS, supostamente promovido pelo VHC, podendo constituir um mecanismo compensatório. Revelou-se também uma tendência de aumento (19,7%) entre os grupo II e III, na atividade da GPx, confirmando um dano oxidativo na hepatite C crônica, novamente sugerindo que, além da presença do próprio vírus da hepatite C promover aumentos de EROs, a terapia utilizada para o tratamento de hepatite C crônica (interferon + ribavirina) poderia estar alterando as defesas antioxidantes. Neste sentido, Kim e colaboradores (2008), mostraram que o tratamento com interferon- γ por um período crônico causa senescência celular através do dano ao DNA e da geração de EROs, através da disfunção mitocondrial e do aumento da atividade da NADPH oxidase. Além disso, células tratadas com interferon- γ , estimulam a expressão de iNOS pela ativação do NF κ B nos macrófagos, onde a interação de \cdot NO e $O_2\cdot$ rapidamente gera peroxinitrito, uma espécie altamente reativa de nitrogênio deletéria a proteínas, lipídios e DNA (YANAGISAWA *et al.*, 2008).

Após a suplementação antioxidante, foi observado um aumento significativo da atividade da glutathiona peroxidase no grupo II ($p < 0,05$) e uma diminuição significativa no grupo III ($p < 0,05$), perfil semelhante ao apresentado pela SOD, embora a atividade da SOD não tenha apresentado alterações estatisticamente significativas. A diminuição da atividade da GPX pós-suplementação poderia ser decorrência principalmente da ação da vitamina E, com ação sinérgica da vitamina C, em diminuir o dano oxidativo promovido pelas EROs e pelo processo de lipoperoxidação e, conseqüentemente, diminuindo a atividade da GPx.

Em outro estudo envolvendo pacientes com hepatite C crônica, foi observado um aumento significativo da GPx entre os pacientes, antes e após tratamento com interferon associado à ribavirina (LEVENT *et al.*, 2006), sugerindo que a terapia com interferon associada à ribavirina poderia estar aumentando a atividade da glutathiona peroxidase, conforme verificado neste trabalho, embora não tenha apresentado um aumento estatisticamente significativo. De modo semelhante, Boya e colaboradores (1999) não encontraram alterações significativas entre indivíduos saudáveis e pacientes com hepatite C crônica, igualmente revelando uma tendência de aumento na atividade da glutathiona peroxidase. Já Chrobot e colaboradores (2000), encontraram aumento significativo na atividade da GPx entre indivíduos saudáveis e

com hepatite C crônica, sugerindo o mesmo mecanismo compensatório de ação antioxidante perante a geração de EROs, como o verificado neste trabalho.

Uma diminuição (76,8%; $p < 0,01$) entre o grupo controle negativo (GI) e grupo controle positivo (GII) na atividade da GR foram encontradas durante as determinações iniciais. No entanto, este resultado não condiz com o estudo de Ko e colaboradores (2005), que mostraram um aumento significativo na atividade da glutathione redutase nos pacientes com hepatite C crônica, quando comparados a indivíduos saudáveis. Sendo a GR uma flavoproteína que permite a contínua conversão de GSSG para GSH via oxidação do NADPH para NADP, sugere-se que esta diminuição perante o dano oxidativo estabelecido pelo HCV, poderia estar relacionada à depleção dos níveis de GSH sanguíneos (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2006). Entre o grupo controle positivo e grupo experimental, também foi observada uma alteração significativa, com aumento da atividade da GR ($p < 0,001$), sugerindo um efeito pró-oxidante do interferon associado à ribavirina.

Após a intervenção antioxidante ocorreu uma diminuição fortemente significativa (85,3%; $p < 0,001$) na atividade da GR no grupo III, reiterando a eficácia relacionada com o efeito redutor da suplementação encontrado nas outras enzimas já descritas anteriormente. Entretanto, o estudo de Serejo e colaboradores (2003) mostrou efeitos antioxidantes do interferon, o que contrasta com o resultado deste trabalho. Entretanto, Liu e colaboradores (2002) não encontraram efeitos do interferon nos marcadores de estresse oxidativo em pacientes com hepatite C, assim como Vendemiale e colaboradores (2001), que igualmente não observaram nenhum efeito do interferon na diminuição de EROs em ratos com fibrose hepática, pelo vírus da hepatite C. No grupo II não foi observada diferença estatística após a suplementação, permanecendo inalterada a atividade da glutathione redutase.

Considerando as determinações iniciais, a GST não apresentou alterações significativas entre os grupos I e II, segundo o teste *t* de Student não pareado. Já entre os grupos II e III, foi observado um aumento significativo (361,2%; $p < 0,001$) através da ANOVA de duas vias seguida do pós-teste de Bonferroni, novamente indicando que a terapia do interferon associada à ribavirina poderia estar diminuindo as defesas antioxidantes. Neste particular, aumentos da atividade da GST vêm sendo estudados como um possível marcador de lesão hepática em pacientes com hepatite C crônica, pois a GST também regula a síntese de leucotrienos e prostaglandinas, assim como a resposta imune e inflamatória. No caso de pacientes

com hepatite C ocorre uma elevação plasmática de citocinas, como TNF- α e IL2, que favorecem a lesão hepática, além de aumentar a produção de EROs (OLIVEIRA Jr., 2004). Durante a detoxificação hepática via citocromo P450, Fase I da biotransformação destes medicamentos, metabólitos secundários considerados tóxicos são produzidos, a GST, uma enzima de Fase II deste processo que protege as células contra vários agentes carcinogênicos e toxinas eletrofílicas, age na detoxificação de agentes xenobióticos, através da catalização das reações destes agentes com o grupo SH da glutationa, neutralizando-os e tornando-os mais facilmente excretáveis (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2006). Deste modo, sugere-se que o aumento na atividade da glutationa-S-transferase poderia ser consequência desta ação de Fase II.

Depois do período de intervenção com a suplementação antioxidante, observou-se diminuição significativa da atividade da GST nos grupos suplementados (II e III, 86,2 % e 96,0%, respectivamente), acompanhando coerentemente os recuos já assinalados para as atividades da CAT e GR, bem como nos conteúdos de proteína carbonilada. Como a GST está também envolvida na eliminação de hidroperóxidos, a diminuição acentuada dos níveis de proteína carbonilada no grupo III suplementado provavelmente estaria relacionada com a diminuição de sua atividade após a suplementação antioxidante.

A diminuição dos conteúdos de GSH intracelulares e/ou mitocondriais na hepatite C crônica já foi demonstrada em outros trabalhos (ABDALLA *et al.*, 2005; KORENAGA *et al.*, 2005). A depleção da concentração da GSH poderia estar envolvida com o aumento dos níveis plasmáticos de TNF- α , relação já encontrada também em cultura de células (ISHII *et al.*, 1992; PHELPS *et al.*, 1995), e, de modo coerente, os níveis de TNF- α plasmáticos mostraram-se elevados em pacientes com hepatite C crônica (LEVENT *et al.*, 2006). Nas determinações iniciais não houve diferença estatística nos conteúdos de GSH entre os grupos I e II, segundo o teste *t* de Student não pareado, embora tenha sido observada uma forte tendência de diminuição (40,9%), sugerindo que o HCV, através de proteínas virais, principalmente estruturais (*core*), tende a diminuir as concentrações de GSH e aumentar as concentrações de GSSG, efeitos consistentes com a elevação de EROS, caracterizando um dano oxidativo (ABDALLA *et al.*, 2005).

Após a suplementação antioxidante com vitaminas E, C e o mineral Zn, verificaram-se aumentos fortemente significativos nos conteúdos de GSH nos grupos II e III suplementados (354,15% e 157,2%, respectivamente), podendo estar relacionados, além da interação direta da GSH com a ação das vitaminas C e E (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2006), com a ação antioxidante do Zn. Este metal aumenta a biossíntese de GSH pela glutamato-cisteína ligase (GCL), aumentando a expressão do RNAm da GCL, através do fator de transcrição nuclear eritrocitário (Nrf2) (CORTESE *et al.*, 2008). Além disso, tem sido demonstrado que o Zn em concentrações não tóxicas protege a indução de estresse oxidativo provocada pelo H₂O₂ (CHUNG *et al.*, 2005; SUNTRES & LUI, 2006). A suplementação de Zn também aumenta a expressão da metalotioneína, que, sob condições de elevado estresse oxidativo, promoveria liberação do Zn ligado à metalotioneína, resultando em maior disponibilidade de agrupamentos sulfidrila reduzidos da metalotioneína, prontos para atuar na proteção antioxidante. Por sua vez, o Zn liberado seria redistribuído na célula, podendo ser utilizado em outros mecanismos de proteção antioxidante (MARET, 2000). Estudos sugerem que uma diminuição da concentração de GSH, além da própria indução de EROs na transformação de TGF- β , mediarão efeitos profibrogênicos, aumentando a síntese de colágeno, consequentemente causando esteatose que culminaria em fibrose hepática (SOYLU *et al.*, 2006; CHOI & JAMES-OU, 2006). Por outro lado, sugere-se que a vitamina E regula a secreção de colágeno de células estreladas hepáticas, pela diminuição da transformação de TGF- β (SOYLU *et al.*, 2006; CHOI & JAMES-OU, 2006).

Nas determinações iniciais, a concentração de vitamina E mostrou depleção significativa ($p < 0,001$) em pacientes com hepatite C (GII), quando comparados ao grupo controle negativo (GI), sugerindo que esta depleção poderia estar associada ao dano oxidativo promovido pela presença do VHC, conforme verificado pelo aumento dos outros componentes das defesas antioxidantes já comentados. Já entre os grupos II e III, foi observado um aumento significativo na concentração de vitamina E, sugerindo que a terapia com interferon associada à ribavirina, por diminuir a replicação viral devido às suas propriedades características de ação antiviral, poderia estar contribuindo para manutenção da integridade do tecido hepático, consequentemente preservando a função da proteína transportadora de α -tocoferol localizada nos hepatócitos (MUSTACICH *et al.*, 2007). Em função disto, a concentração de vitamina E nos pacientes em tratamento com interferon associado à

ribavirina foi similar àquela do grupo controle negativo (GI), e dentro das concentrações séricas normais de vitamina E (21 a 27 $\mu\text{mol/L}$) (SCHWEDHELM *et al.*, 2003).

Após a suplementação antioxidante foi observada uma forte tendência de aumento da concentração de vitamina E no grupo II (58,4%). No entanto, no grupo III observou-se uma diminuição significativa da concentração de vitamina E (34,0%, $p < 0,001$), após 6 meses de intervenção antioxidante. Segundo Mustacich e colaboradores (2007), a concentração de α -tocoferol no plasma e tecidos extra-hepáticos não aumenta mais do que aproximadamente 3 vezes, pois a proteína transportadora de α -tocoferol aumenta nos rins e intestino quando administrada em altas doses, com exceção do fígado, onde o excesso de α -tocoferol parece ser sequestrado e rapidamente metabolizado e/ou excretado, corroborando os resultados encontrados no presente estudo. A diminuição da concentração de vitamina E no grupo III poderia estar relacionada tanto à mobilização de seus estoques, como ao aumento de seu catabolismo e a sua função antioxidante de seqüestrar EROS (MINGJIAN *et al.*, 1992; MAGHIT *et al.*, 2000), o que explicaria também a melhora do biomarcadores de estresse oxidativo neste grupo.

Analisando as concentrações de Zn antes da suplementação, não foram verificadas alterações significativas entre os grupos I e II, conforme o teste *t* de Student não pareado. Entretanto, as concentrações de Zn iniciais nos três grupos ficaram acima dos níveis normais, que giram em torno de $0,7 \mu\text{g mL}^{-1}$ no plasma e $4,22 \pm 0,56 \mu\text{g mL}^{-1}$ nos eritrócitos (GIBSON, 1990). Em trabalho recente, Ko e colaboradores (2005) mostraram uma depleção de Zn eritrocitário e plasmático em pacientes com hepatite C crônica, quando comparados a indivíduos saudáveis ($0,79 \pm 0,05$ vs. $1,4 \pm 0,01 \mu\text{g mL}^{-1}$; $0,13 \pm 0,01$ vs. $0,55 \pm 0,06 \mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente), assim como os valores encontrados por Suzuki e colaboradores (2006), em um estudo com pacientes com hepatite C em tratamento com interferon associado à ribavirina ($0,69 \pm 0,17$ vs. $0,73 \pm 0,21 \mu\text{g mL}^{-1}$). O Zn possui efeitos antiinflamatórios, propriedades antioxidantes e efeitos imunomodulatórios, além de ser necessário para a dimerização do interferon, sendo que esta forma pode ativar receptores de interferons, e, conseqüentemente, aumentar a eficácia da terapia para hepatite C crônica (RADHAKRISHNAN *et al.*, 1996).

Após a suplementação antioxidante, não foi observada nenhuma alteração significativa, permanecendo inalteradas as concentrações de Zn sanguíneas em ambos os grupos suplementados. Isto poderia estar relacionado com a biossíntese da glutatona reduzida, visto que a concentração da mesma aumentou significativamente em ambos os grupos, sendo o Zn utilizado para este fim. Além disso, sugere-se uma ação sinérgica do Zn com aumento do efeito do interferon, pois a deficiência de Zn tem sido associada à diminuição da concentração de citocinas como interferon- γ , além de ser necessário para a dimerização do interferon, que ativa os seus receptores (TAKAGI *et al.*, 2001).

Nas determinações iniciais, as concentrações de Fe eritrocitário não apresentaram alterações significativas entre os grupos I e II, embora tenha sido observada uma tendência de diminuição (9,5%). Foi observada também uma tendência de diminuição entre os grupos II e III (9,9%), talvez reforçando o fato de que a terapia para VHC, principalmente a ribavirina, tem como efeito colateral causar hemólise das células vermelhas, aumentando as concentrações de ferro livre (FONTANA *et al.*, 2000), e conseqüentemente, elevando a produção de radicais hidroxil via reação de Fenton, aumentando ainda mais o dano oxidativo em pacientes HCV. Alternativamente, poderiam aumentar as concentrações de transferrina ou ferritina séricas, como resultado da liberação de ferro dos hepatócitos lesados, característico nos pacientes com VHC em tratamento com interferon peguilado associado à ribavirina (FONTANA *et al.*, 2000; ANGULO *et al.*, 1999). Contrapondo-se a estes resultados, Ko e colaboradores (2005) verificaram um aumento da concentração de Fe eritrocitário em pacientes com hepatite, quando comparados aos indivíduos saudáveis.

Após a suplementação com vitaminas E, C e o mineral Zn, não foi observada nenhuma alteração significativa em ambos os grupos suplementados, apenas uma tendência de diminuição, sugerindo que, embora nas determinações iniciais as concentrações eritrocitárias não tenham apresentado concentrações acima dos valores normais, a suplementação teria promovido diminuição das concentrações de Fe eritrocitária. Embora as concentrações de Fe eritrocitária nas determinações iniciais tenham apresentado este perfil, o presente estudo mostrou a presença de dano oxidativo em pacientes com VHC, tanto em tratamento como em pacientes não tratados. Isto poderia refletir-se no aumento da atividade dos marcadores de dano oxidativo, principalmente pela depleção de glutatona reduzida, a qual interfere na

liberação de Fe da hemoglobina, com formação de metahemoglobina, tornando o Fe disponível para participar da formação do radical hidroxila intracelular (WELCH *et al.*, 2002).

Após a suplementação antioxidante, observou-se também uma diminuição significativa nestes marcadores, sugerindo uma ação eficaz da terapia antioxidante em diminuir a provável geração de radicais hidroxil nos pacientes avaliados.

A concentração de TBARS, determinada como avaliação da peroxidação lipídica, não apresentou alterações significativas entre os controles e os pacientes com hepatite C, embora tenha sido observada uma tendência de aumento. Também foi observada uma tendência de diminuição entre os pacientes com hepatite C e pacientes com hepatite C em tratamento com interferon associado à ribavirina, segundo a ANOVA de duas vias seguida do teste de Bonferroni. Estes resultados concordam com o estudo de Levent e colaboradores (2006), onde foi verificado um aumento das concentrações de malondialdeído (principal produto da lipoperoxidação) entre indivíduos saudáveis e pacientes com hepatite C antes do tratamento, e uma diminuição significativa após o tratamento com interferon associado à ribavirina ($4,20 \pm 1,47$ vs. $9,28 \pm 1,61$ vs. $4,88 \pm 1,22$ nmol mL⁻¹), como também constatado no presente trabalho. Resultados semelhantes foram obtidos no estudo de Yadav e colaboradores (2002), onde foi observada uma maior concentração de malondialdeído em pacientes com moderada/severa inflamação e/ou fibrose, comparados com aqueles com pouca inflamação e/ou fibrose, reiterando os resultados obtidos aqui obtidos, pois o tratamento com interferon associado à ribavirina tende a diminuir a inflamação.

Após 6 meses de suplementação antioxidante, não foi observada nenhuma alteração no grupo III, provavelmente pela ação antioxidante da vitamina E, com ação sinérgica da vitamina C, em proteger as membranas lipídicas do ataque de EROs, especialmente de peróxido de hidrogênio, já que as concentrações de TBARS no grupo III pós-suplementação permaneceram semelhantes às do grupo I – controle negativo. Groenbaek e colaboradores (2006) avaliaram o efeito da suplementação com vitamina E em pacientes com hepatite C crônica, e também não observaram nenhuma diferença consistente nas concentrações de malondialdeído, concordando com os resultados obtidos no presente estudo. Por outro lado, no grupo II, houve uma tendência de aumento nos conteúdos de TBARS durante a determinação inicial, e após a suplementação antioxidante, foi observada uma

diminuição significativa, sugerindo que, além da proteção antioxidante da vitamina E, a terapia antiviral poderia estar mantendo o dano oxidativo às membranas lipídicas, consequentemente mantendo elevadas as concentrações de TBARS, durante o tratamento de hepatite C crônica.

Contraopondo-se aos resultados de TBARS, o dano oxidativo às proteínas, determinado pela avaliação dos conteúdos de proteína carbonilada, não apresentou alterações significativas entre os grupos I e II, segundo o teste *t* não pareado. Já entre os grupos II e III, foi observado um aumento acentuado (372,4% - $p < 0,001$) nos conteúdos de proteína carbonilada, segundo análise ANOVA de duas vias seguida do teste de Bonferroni, sugerindo que a terapia antiviral poderia estar promovendo maior geração de EROs, e que, consequentemente, estariam causando maior dano oxidativo às proteínas. De modo semelhante, em estudo realizado por Kokën e colaboradores (2002), foi constatado um aumento significativo nos conteúdos de proteína carbonilada nos pacientes com hepatite C, quando comparados aos pacientes com hepatite C em hemodiálise.

Após a intervenção antioxidante, não foi observada nenhuma alteração significativa no grupo II, permanecendo inalterados os conteúdos de proteína carbonilada. No entanto, no grupo III houve uma diminuição significativa nos níveis de PC (85,7%), sugerindo uma possível ação do Zn, ligando-se a grupos sulfidrilas de proteínas, estabilizando e diminuindo a reatividade com metais de transição pró-oxidantes (POWELL, 2000).

As enzimas aminotransferases são utilizadas rotineiramente para *screening*, diagnóstico e monitoramento nas hepatites virais, porém na hepatite C valores de AST e ALT podem não estar correlacionados com parâmetros histológicos da severidade da doença (PARK *et al.*, 2000). No presente trabalho, não houve alterações na atividade da AST entre os diferentes grupos, assim como após a intervenção com a suplementação antioxidante durante 6 meses, sugerindo que a AST não é um bom marcador para avaliação histológica em pacientes com hepatite C crônica. Ao contrário da AST, e considerando as determinações iniciais da ALT, verificou-se aumento significativo (311,8% - $p < 0,001$) entre os grupos I e II, segundo o teste *t* de Student não pareado. Isto confirma que na hepatite C crônica, elevações da ALT são mais freqüentes que a AST, devido ao fato da ALT situar-se majoritariamente no citoplasma das células do parênquima do fígado, sendo, portanto, melhor marcador de doenças hepáticas (GIANNINI *et al.*, 2003).

Após a suplementação antioxidante, não houve diferenças significativas nos grupos suplementados, porém observou-se uma tendência de aumento no grupo III (19,6%), podendo eventualmente estar correlacionada com o uso da terapia antiviral empregada, com a metabolização de xenobióticos, alterando a atividade da ALT. Analisando-se a relação AST/ALT, foi observado que apenas o grupo III antes da suplementação antioxidante estaria apresentando maior dano hepático (AST/ALT = 1,07), sendo que após a suplementação antioxidante houve uma tendência de diminuição nesta relação (22,4%).

Em relação à fosfatase alcalina, outra enzima utilizada como marcadora em inflamações, nas determinações iniciais verificou-se uma diminuição significativa entre os grupos I e II (50,3% - $p < 0,001$). Considerando a análise da ANOVA em duas vias seguida do pós-teste de Bonferroni, foi observado um aumento fortemente significativo (153,5%) na atividade da ALP entre os grupos II e III, indicando que a terapia antiviral poderia ser responsável por este aumento, embora a mesma seja inespecífica. A fosfatase alcalina, mesmo sendo relativamente inespecífica, tem sua forma predominante no soro e origina-se principalmente no fígado e esqueleto, podendo então ser considerada um bom marcador de doenças hepáticas (GIANNINI, 2005). Após 6 meses de suplementação, verificou-se uma forte diminuição significativa (57,8%) no grupo III, enquanto que no grupo II não foi observada nenhuma alteração significativa.

Assim como a AST, a gama-glutamilttransferase (GGT), não apresentou alterações entre os diferentes grupos durante as determinações iniciais, e tampouco após a intervenção com vitaminas C, E e o mineral Zn. Estudo similar comparando indivíduos saudáveis, em pacientes com hepatite C, antes e após tratamento com interferon associado à ribavirina, verificou um aumento significativo da AST e ALT entre os indivíduos saudáveis e pacientes com hepatite C antes do tratamento, e, comparando estes indivíduos após o tratamento, mostrou uma diminuição significativa, sugerindo que a ação da terapia antiviral diminuiu a replicação do HCV, e, conseqüentemente diminuindo a injúria ao tecido hepático (LEVENT *et al.*, 2006). Entretanto, Groenbaek e colaboradores (2006), em estudos com pacientes com hepatite C crônica, não observaram nenhuma alteração nas transaminases após suplementação com vitamina E, C e selênio. Por outro lado, Gomez e colaboradores (2007) mostraram uma diminuição significativa na atividade da ALT após

suplementação antioxidante contendo Zn, assim como também Hino e colaboradores (2006), utilizando como antioxidantes as vitaminas C e E.

Estudos recentes têm sugerido que a GGT sérica poderia constituir-se em um marcador precoce de estresse oxidativo (LIM *et al.*, 2004; LEE *et al.*, 2004), o que não foi observado no presente trabalho. A função primária da GGT celular é metabolizar a GSH extracelular, permitindo que precursores aminoácidos sejam assimilados e reutilizados para a síntese de GSH intracelular. No entanto, o perfil dos níveis de GSH antes da suplementação nos diferentes grupos não acompanhou os resultados apresentados pela GGT. Já após a suplementação, o perfil da GSH acompanhou a atividade da GGT, embora esta não tenha apresentado uma alteração significativa, apenas uma tendência de aumento de 37,1%. A suplementação antioxidante permitiu reverter a depleção dos níveis de GSH promovida, tanto pelo quadro de hepatite C crônica, como pelo tratamento anti-viral, para níveis normais semelhantes aos controles negativos.

A atividade *killing* de neutrófilos ocorre através da produção de EROs e a desgranulação enzimática, que juntos, completam a bateria microbicida destas células, sendo que dentre as enzimas liberadas está a mieloperoxidase (SILVA, 2001). O ácido hipocloroso (HOCl) produzido pelos neutrófilos através da mieloperoxidase, apresenta intensa ação tóxica sobre as bactérias, sendo que em muitas patologias inflamatórias, como fibrose cística e artrite reumatóide, também causa lesão tecidual (GOLDBLUM *et al.*, 1985). Nas determinações iniciais não foi detectada nenhuma alteração estatisticamente significativa na atividade de MPO entre os grupos, I e II, segundo o teste *t* não pareado. Considerando a intervenção com suplementação antioxidante durante 6 meses, foi observada apenas diferença significativa no grupo II, com aumento da atividade da mieloperoxidase ($p < 0,05$). Segundo Dikici e colaboradores (2005), peróxidos lipídicos formados podem ser quimiotáticos para neutrófilos, causando aumento do processo inflamatório, e, conseqüentemente, aumento da injúria celular mediada por EROs, o que poderia ocasionar um aumento da mieloperoxidase no grupo II, já que foi observada uma tendência de aumento na concentração de TBARS neste grupo. Entretanto, os resultados obtidos sugerem que, devido ao fato da mieloperoxidase ser encontrada predominantemente em neutrófilos, e os portadores de inflamação crônica possuírem baixas concentrações destas células, sendo predominante o infiltrado

linfocitário, ausência de alteração na atividade desta enzima não confere comprometimento aos pacientes quanto à sua ação microbicida.

No presente trabalho foi possível evidenciar que a provisão diária de vitaminas antioxidantes e minerais como o zinco é essencial, pelo menos durante o período examinado, não somente como intermediários no metabolismo, mas também para as funções inerentes à cicatrização (Lima & Serra, 2002), imunidade celular (JACOB *et al.*, 2008; WINTERGERST *et al.*, 2006), e, notadamente, na ação antioxidante. Estudos que demonstram a atividade aumentada de EROs e diminuição dos níveis de antioxidantes durante o estresse oxidativo agudo e crônico, implicam em necessidades maiores para nutrientes com capacidade antioxidante (Prelack & Sheridan, 2001). Em estudo recente envolvendo pacientes pediátricos do Hospital Infantil Joana de Gusmão de Florianópolis, vítimas de queimaduras leves e moderadas mostraram a importância da reposição de certos metais-traços essenciais e suplementos vitamínicos (antioxidantes nutricionais) nestes pacientes (BARBOSA *et al.*, 2009).

Em resumo, no presente trabalho, o estresse oxidativo provocado pelo vírus da hepatite C ou pela progressão da doença foi constatado através do aumento das defesas antioxidantes, como um mecanismo compensatório ao provável aumento de EROs produzidas pela presença viral (quadro sinóptico; figura 29). Além disso, sugere-se neste trabalho que o tratamento para hepatite C, envolvendo o uso interferon peguilado associado à ribavirina, poderia estar exacerbando ainda mais a geração de EROs e, destarte, do estresse oxidativo nos pacientes com VHC, constatado pelo aumento significativo das enzimas antioxidantes como GR e GST (somadas às de tendências de aumento da atividade das enzimas CAT e GPx), além da ALP, pelo aumento dos conteúdos de PC, bem como pela depleção dos conteúdos de GSH nos pacientes com VHC em tratamento antiviral. Em relação aos níveis de TBARS, verificou-se que podem constituir um melhor marcador de dano oxidativo em pacientes com VHC antes do tratamento antiviral, por ação da própria presença do vírus da hepatite C, enquanto que o aumento do dano oxidativo às proteínas poderia ser consequência de resposta ao tratamento com inteferon peguilado associado à ribavirina por algum mecanismo ainda não esclarecido.

Por outro lado, a suplementação antioxidante, utilizando concomitantemente doses diárias de 800 mg de vitamina E, 500 mg de vitamina C e 40 mg de Zn, conferiu uma proteção redutora nos pacientes com hepatite C crônica em tratamento

com interferon associado à ribavirina. Esta suplementação combinada permitiu diminuir os processos de oxidação às proteínas, restabeleceu os conteúdos sanguíneos de GSH, diminuiu significativamente as atividades da GST, GR e CAT, enquanto que a atividade da MPO ficou inalterada, porém e aparentemente, não comprometendo o processo inflamatório.

Em outras palavras, a suplementação antioxidante envolvendo os antioxidantes nutricionais como as vitaminas C e E mostraram-se eficientes no sentido de atenuar o quadro de estresse oxidativo vinculado à hepatite C crônica. De modo semelhante, resultados similares obtidos em outras doenças crônicas relacionadas com o estresse oxidativo, pacientes chagásicos com cardiopatia crônica, em estudos recentemente desenvolvidos em nosso laboratório (OLIVEIRA *et al.*, 2007; MAÇAO *et al.*, 2007; RIBEIRO, 2009), e em analogia a outros estudos envolvendo demais patologias crônicas (YADAV *et al.*, 2002; HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2006; SOYLU *et al.*, 2006; CORTESE *et al.*, 2008), igualmente mostraram a eficácia de terapias antioxidantes, apesar de autores que discordam desta eficiência terapêutica (BRIGELIUS-FLOHÉ, 2009).

A figura 29 representa o quadro sinóptico dos resultados obtidos no presente trabalho, para melhor visualização conjunta dos dados obtidas. Reiterando a síntese do presente estudo, é possível discernir o comportamento diferenciado nos dois momentos experimentais relativamente aos biomarcadores do estresse oxidativo examinados: 1) nos pacientes com VHC sem suplementação antioxidante, houve aumento generalizado das atividades enzimáticas, consumo de antioxidantes não enzimáticos, aumento de lipoperoxidação (TBARS), oxidação de proteínas (PC) e da mieloperoxidase (MPO). Após suplementação antioxidante, houve reversão generalizada destes parâmetros, sugerindo a compensação antioxidante promovida pela adição de antioxidantes nutricionais.

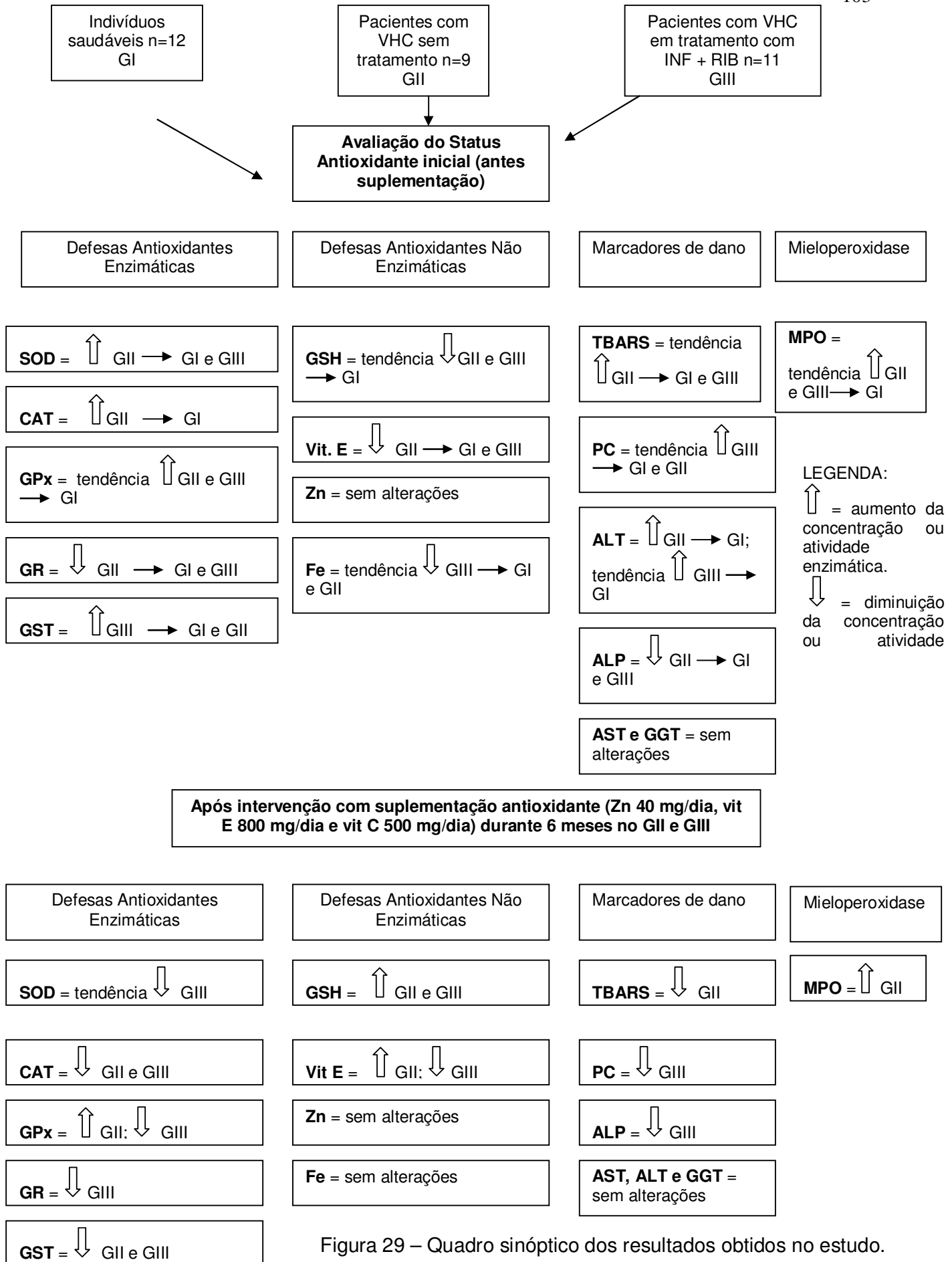


Figura 29 – Quadro sinóptico dos resultados obtidos no estudo.

6 CONCLUSÕES

- As determinações antes da suplementação mostraram que a atividade de algumas enzimas (CAT, SOD, MPO, ALT) mostraram-se aumentadas e as concentrações da GSH e vitamina E foram depletadas nos pacientes com hepatite C sem tratamento, confirmando o envolvimento do estresse oxidativo nesta patologia, de acordo com dados existentes na literatura.
- De modo semelhante, foi observado um aumento das atividades enzimáticas da CAT, GST e GR, e aumentos das concentrações de proteína carbonilada e depleção dos conteúdos de GSH, em pacientes com hepatite C em tratamento com interferon peguilado associado à ribavirina, tanto quando comparado ao controle negativo (banco de sangue), como quando comparado ao grupo dos pacientes com hepatite C sem tratamento, sugerindo uma ação pró-oxidante do interferon e/ou da ribavirina, tanto contrariando como confirmando dados congêneres existentes na literatura.
- De uma maneira geral, observou-se uma diminuição, ou uma tendência de diminuição das defesas antioxidantes enzimáticas após a suplementação antioxidante, exceto para a SOD e GPx, nos pacientes com hepatite C sem tratamento, o que sugere que a suplementação antioxidante foi efetiva em atenuar o estresse oxidativo nestes pacientes.
- A vitamina E apresentou depleção nos pacientes com VHC em tratamento com interferon associado à ribavirina (grupo III), a qual foi correlacionada com uma diminuição das defesas antioxidantes enzimáticas e um aumento significativo dos conteúdos de GSH, novamente confirmando a eficácia de suplementação, paralelamente à ação pró-oxidante do tratamento com interferon associado à ribavirina.
- O Zn manteve suas concentrações sanguíneas inalteradas, sugerindo-se uma ação deste mineral na biossíntese na GSH, observado pelo aumento significativo deste tripeptídeo em ambos os grupos.

- A suplementação antioxidante diminuiu ou manteve inalterados os processos de lipoperoxidação e oxidação de proteínas, essencialmente em todos os grupos, atenuando os danos causados pelo estresse oxidativo, reforçando a eficácia redutora nestes processos.
- Em relação ao TBARS, verificou-se que este pode constituir em um melhor marcador de dano oxidativo antes do tratamento, por ação do próprio vírus da hepatite C, enquanto o dano oxidativo às proteínas (PC) poderia estar associada à ação do interferon peguilado associado à ribavirina por algum mecanismo ainda não esclarecido.
- A suplementação antioxidante, utilizando concomitantemente doses de 800 mg diárias de vitamina E, 500 mg de vitamina C e 40 mg de Zn, conferiu uma proteção redutora nos pacientes com hepatite C crônica em tratamento com interferon associado à ribavirina. Mais especificamente, esta suplementação combinada permitiu diminuir os níveis de PC, aumentou os conteúdos de GSH, diminuiu significativamente a indução das atividades das enzimas GST, GPx, GR e CAT, enquanto que a atividade da MPO ficou inalterada, porém não comprometendo o processo inflamatório.
- Através dos resultados obtidos no presente trabalho, é possível concluir que o uso da terapia antioxidante, através das vitaminas E,C e do mineral Zn, tem grande relevância no sentido de atenuar os danos decorrentes do estresse oxidativo associados à doença, principalmente durante a terapia com interferon peguilado associado à ribavirina, sugerindo sua utilização futura para aumentar a resposta virológica sustentada.

7 PERSPECTIVAS

Os resultados obtidos no presente trabalho indicam várias possibilidades futuras, tanto na melhor avaliação dos efeitos de suplementação antioxidante, como na eventual utilização do interferon peguilado em monoterapia e a ribavirina em monoterapia associado a esta suplementação. Desta forma, seria oportuno averiguar:

- O efeito de suplementação antioxidante (vitaminas E, C e o mineral Zn) associada ao tratamento com interferon peguilado isoladamente em monoterapia na hepatite C crônica, no sentido de avaliar o quadro de estresse oxidativo provocado pelo próprio fármaco no hospedeiro (modelo animal em ratos), juntamente com o benefício da terapia antioxidante, conforme verificado neste estudo.
- O efeito de suplementação antioxidante (vitaminas E, C e o mineral Zn) associada ao tratamento com ribavirina isoladamente em monoterapia na hepatite C crônica, no sentido de avaliar o quadro de estresse oxidativo provocado pelo próprio fármaco no hospedeiro (modelo animal em ratos), juntamente com o benefício da terapia antioxidante, conforme verificado neste estudo.
- O mecanismo intrínseco de geração de EROs ou efeito antioxidante do interferon e da ribavirina em modelo animal (ratos).
- O dano ao DNA (teste cometa ou aductos de DNA como a 8-oxoguanosina), a quantidade de $\cdot\text{NO}$ pelo nitrito/nitrato e a nitração de proteínas (níveis de 3-nitrotirosina), como marcadores de dano oxidativo adicionais.
- A capacidade antioxidante total (FRAP) dos pacientes com hepatite C crônica, se possível, antes e após a suplementação antioxidante, como ferramenta mais prática e acessível (apesar de sua inespecificidade), no sentido de monitorar rotineiramente a evolução da doença e o *status* antioxidante dos pacientes, notadamente em número elevado de amostras.

8 APÊNDICES

8.1 Apêndice I – Anamnese Nutricional, Recordatório Alimentar de 24h e Questionário de Frequência Alimentar



ANAMNESE NUTRICIONAL

Dados Pessoais:

Nome: _____ Sexo: () F () M
 Idade: _____ Profissão: _____
 Email: _____
 Telefone: _____

Aspectos Gerais:

Atividade Física: () Sim () Não
 Qual? _____ Quantidade de horas/sem: _____
 Fuma? () Sim () Não Quantos? _____
 Bebida Alcoólica? () Sim () Não
 Doenças:
 () Diabetes () Hipertensão () Apnéia
 () Artrite () Hipercolesterolemia
 () Outras: _____

Doenças Familiares:

() Diabetes () Hipertensão () Apnéia
 () Artrite () Hipercolesterolemia
 () Outras: _____

Medicação em uso: _____

Ritmo intestinal: () Normal () Diarréia () Constipação

Intolerância alimentar:

Preferência alimentar:

Ingestão de líquidos com frequência: () Sim () Não Número de copos? _____

Suplementos alimentares em uso? () Sim () Não Quais? _____

Quem prepara as refeições? _____

Refeições em casa? _____

Exames bioquímicos:

Glicose – _____

Colesterol total – _____

Açúcar								
Mel								
Adoçante								
Achocolatado								
Pão	Integral, branco							
Bolo	Simples, recheado							
Biscoito	Integral, doce, salgado, amanteigado							
Queijo	Amarelo, branco							
Presunto	Frango Peito de peru Chester Mortadela Pobre em gordura Defumado Não defumado							
Margarina	Com gordura trans, sem gordura trans							
Maionese, catchup ou mostarda								
Requeijão	Normal, light							
Geléia de frutas								
Doce de leite								
Frutas (coloração): Amarelas Alaranjadas Vermelhas Verde Roxa Branca	“In natura”, suco, purê, vitaminas							
Arroz	Branco, integral, selvagem							
Macarrão	Integral ou normal							
Feijão	Preto, vermelho, branco, adzuki							
Lentilha	Cozida, ensopada							
Hortaliças	Cruas, cozida, refogada							
Óleo	Oliva, canola, milho, girassol, soja							
Carne vermelha	Frita, cozida, ensopada							
Frango	Frita, cozida, ensopada							
Peixe	Frita, cozida, ensopada							

8.2 Apêndice II – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TERMO CONSENTIMENTO

PROJETO: AVALIAÇÃO DA INTERVENÇÃO NUTRICIONAL COM VITAMINAS C E E, E O MINERAL ZINCO NO ESTRESSE OXIDATIVO E NAS DEFESAS ANTIOXIDANTES DE PACIENTES COM HEPATITE C EM TRATAMENTO COM INTERFERON ASSOCIADO À RIBAVIRINA.

Responsáveis: Danilo Wilhelm Filho, residente na Rodovia SC 405, 435A, Fazenda Rio Tavares, Florianópolis. Telefone: 048-32374145
Mirelle Sifroni Farias, residente na Rua Francisco Tolentino, 800, apartamento 505, Centro, Florianópolis. Telefone: 048-32232291/048-99410291

Estas informações estão sendo fornecidas para sua participação voluntária neste estudo, que tem como objetivo **avaliar a intervenção nutricional com vitaminas C e E e o mineral Zn no estresse oxidativo e nas defesas antioxidantes de pacientes com hepatite C em tratamento com interferon associado à ribavirina.**

Os pesquisadores, Danilo W. Filho e Mirelle Sifroni Farias farão a consulta de seu prontuário, coletando informações, dentre estas: idade, tempo de diagnóstico da doença, tempo de tratamento com interferon associado à ribavirina, assim como sua dosagem e período de uso. Para a avaliação da ingestão alimentar serão coletadas informações de sua dieta através da anamnese alimentar por um questionário de 24 horas de um dia habitual e um questionário de frequência alimentar. E para avaliação de seu estado nutricional, serão coletadas as informações de seu peso e será feita a medição de sua altura. Para avaliação do estresse oxidativo e das defesas antioxidantes, será realizada uma coleta de sangue, com material descartável.

Esta pesquisa tem como principal benefício verificar a eficácia de antioxidantes, como vitaminas C e E, e o mineral zinco no estresse oxidativo e nas defesas antioxidantes, causadas pelo tratamento com interferon associada à

ribavirina em pacientes com hepatite C. Assim, com estes resultados podemos orientar a conduta adequada para evitar complicações provocadas pelo tratamento.

A qualquer momento você terá acesso aos resultados parciais da pesquisa, bem como a qualquer dado referente ao resultado dos exames de sangue.

Você tem a liberdade de querer não participar desta pesquisa ou, no caso de aceitação, retirar seu consentimento a qualquer momento, sem nenhum prejuízo à continuidade de seu tratamento.

A avaliação do seu prontuário médico e dos resultados dos exames somente será realizada pelos pesquisadores envolvidos na pesquisa e médicos responsáveis pelo seu tratamento. Todos os resultados serão de uso exclusivo desta pesquisa. Salientamos, que as consultas ao seu prontuário obedecerão a Resolução CNS 196/96, as disposições legais e normativas em vigor no Brasil, como Código Civil, Código de Defesa do Consumidor, Código de Ética Médica, entre outros, além da autorização prévia da instituição, onde estão localizados os prontuários.

Não há despesas pessoais para o participante em qualquer etapa do estudo, não existindo também, compensação financeira relacionada à sua participação. Havendo comprovação de que tenham ocorrido danos causados diretamente pela pesquisa, você terá direito a tratamento médico na instituição, assim como às indenizações legalmente estabelecidas.

Todos os dados coletados assim como os resultados desta pesquisa serão publicados e divulgados no meio científico sem qualquer identificação pessoal, mantendo sigilo e preservando a sua privacidade. Além disto, somente o médico responsável pelo seu tratamento terá conhecimento sobre os resultados dos exames e de sua avaliação nutricional.

Esse documento será assinado em 2 (duas) vias por ambas as partes, uma pelo pesquisador responsável e outra por você.

Eu, _____, acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações sobre o estudo citado, que li ou que foram lidas para mim.

Eu discuti com a pesquisadora Mirelle Sifroni Farias sobre a minha decisão em participar deste estudo. Ficaram claros os propósitos do estudo, os procedimentos realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta

de despesas e que tenho garantia de acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízos ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido.

Assinatura do Paciente


Data: ___ / ___ / ___.

Assinatura dos Pesquisadores

Data: ___ / ___ / ___.

9 ANEXOS

9.1 Anexo I – Parecer do Comitê de Ética de Pesquisa com Seres Humanos



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA COM SERES HUMANOS
PARECER CONSUBSTANCIADO - PROJETO N º 120/07

I – Identificação

Título do Projeto: "Avaliação da intervenção nutricional com vitaminas C e E, e o mineral zinco no estresse oxidativo e nas defesas antioxidantes de pacientes com Hepatite C em tratamento com Interferon-γ associado com ribavirina".

Pesquisador Responsável: Prof. Danilo Wilhelm Filho (Orientador).

Pesquisador Principal: Mircle Sifroni Farias

Data Coleta dados: maio/2007 a abril/2008.

Local onde a pesquisa será conduzida: Instituto de Medicina do Sistema digestivo Ilha de Santa Catarina.

II - Objetivos: a) **geral:** analisar o efeito da terapia antioxidante, através de um plano alimentar rico em antioxidantes (vitaminas C e E, e o mineral zinco), e da administração de suplementos dos mesmos, nas defesas antioxidantes e no estresse oxidativo de pacientes com hepatite C em tratamento com interferon e ribavirina.

b) **específicos:**

- verificar as diferenças das defesas antioxidantes enzimáticas (superóxido dismutase, catalase, glutatona peroxidase, glutatona redutase, glutatons s-transferase) presentes no sangue dos pacientes com hepatite C em tratamento com interferon e ribavirina, antes e depois de um plano alimentar rico em antioxidantes (vit. C, E e o mineral zinco) e da administração de suplementos dos mesmos;
- verificar as diferenças das defesas antioxidantes não enzimáticas (glutatona reduzida, oxidada e total, teores de vit. C e E), bem como nos níveis de iperoxidação (concentração de TBARS), presentes no sangue dos pacientes com hepatite C em tratamento com interferon e ribavirina, antes e depois de um plano alimentar rico em antioxidantes (vit. C e E e o mineral zinco) e da administração dos mesmos;
- comparar os resultados obtidos antes e depois da intervenção nutricional, através de um plano alimentar rico em antioxidantes (vit. C, E e o mineral zinco) e da administração de suplementos dos mesmos e verificar eventuais modificações no quadro clínico dos pacientes.

III - Sumário do Projeto:

Trata-se projeto de dissertação de mestrado apresentado ao programa de pósgraduação em Farmácia da UFSC. De acordo com os pesquisadores serão avaliados 20 pacientes, com idade entre 30 a 50 anos, com hepatite C em tratamento com interferon e ribavirina, sem doenças associadas como HIV e doenças renais crônicas. O diagnóstico será baseado nas elevações das transaminases séricas, na positividade para anti-HCV (anticorpos) e através de biópsia de fígado.

Um grupo controle será constituído de 20 indivíduos saudáveis, sendo soro negativos para HCV, HBV, HIV, HbsAg, anti-HBc total e anti-HCV. Não poderão apresentar história prévia de hepatite ou alcoolismo crônico, e as aminotransferases deverão estar em concentrações séricas normais.

Os pacientes serão recrutados no ambulatório de Nutrição do Instituto de Medicina do Sistema Digestivo Ilha de Santa Catarina, localizado no Baía Sul Medical Center, em Florianópolis/SC.

Após avaliação antropométricas, energéticas e bioquímicas, será estabelecido um plano normocalórico, normoprotéico e normolipídico, conforme protocolo estabelecido no projeto. Os dados coletados serão expressos em valores médios e desvio-padrão. O teste t de Student simples independente será usado para comparar o grupo de pacientes e o grupo controle.

IV – Comentários frente à Resolução 196/96 CNS e complementares:

O processo contém todos os documentos necessários para sua apreciação. Os objetivos do projeto estão de acordo com a metodologia a ser empregada. O projeto tem relevância científica e os currículos profissionais dos pesquisadores atestam sua capacidade para a realização da pesquisa. No entanto, o TCLE não está de acordo com a Resolução 196/96, já que o TCLE deve conter o endereço e telefone dos pesquisadores para quaisquer dúvidas por parte dos sujeitos, bem como, em caso de desistência na pesquisa.

Outra dúvida em relação ao TCLE é a forma como será obtido, uma vez que não está claro no projeto ou no resumo. Refere apenas que os pacientes serão recrutados no ambulatório de Nutrição do Instituto de Medicina do Sistema digestivo Ilha de Santa Catarina.

Outra questão refere-se a uma declaração dos pesquisadores, onde atestam que farão consultas às fichas de avaliação médica e nutricional, no período de maio de 2007 a dezembro de 2008.

Lembramos que a preservação do sigilo, da privacidade, o acesso e o uso dos prontuários deverá obedecer, não apenas a Resolução CNS 196/96, mas também, as disposições legais e normativas em vigor no país, tais como o Código Civil, o Código de Defesa do Consumidor, o Código de Ética Médica, além de outros.

Em agosto de 2005 a CONEP encaminhou a carta circular nº 23, onde se lê: "*a responsabilidade, para todos os efeitos, decorrentes do acesso e do uso dos prontuários médicos, bem como os relativos à privacidade e ao sigilo, será integralmente dos atores envolvidos*".

Alertamos aos pesquisadores sobre a necessidade de buscar a autorização assinada pelos pacientes, seus responsáveis legais ou familiares. Isto porque a ausência de autorização prévia para utilização dos dados confidenciais dos prontuários, sob a guarda de uma instituição de saúde, fere os princípios bioéticos de autonomia e de não maleficência. Assim, antes de realizar qualquer consulta às fichas dos pacientes, estes antes devem ser contactados pelo médicos responsáveis pela guarda das fichas e prontuários médicos e solicitada sua autorização.

Existe no projeto um termo de consentimento do local de pesquisa. Lembramos que é necessário uma declaração do Instituto de Medicina do Sistema digestivo Ilha de Santa Catarina autorizando a pesquisa e o acesso aos locais onde serão recrutados os sujeitos da pesquisa, resguardando a Resolução CNS 196/96.

Ainda não está claro na pesquisa, que tipo de tratamento por interferon- γ e ribavirina será avaliado, como por exemplo, doses e frequência diária ou semanal de uso destes medicamentos, bem como que tipo de interferon (alfa, gama, "peguilado") usado pelos pacientes será critério para inclusão dos pacientes na

pesquisa. Dentre as análises bioquímicas do projeto, algumas são citadas que serão realizadas em duplicata, porém outras não há menção alguma a realização de mais de uma repetição, pede-se que os pesquisadores atentem a este fato quando da análise estatística ou reformulem o projeto.

Salienta-se que conforme consta dos objetivos específicos "...verificar eventuais modificações no quadro clínico dos pacientes..." cabe aos pesquisadores buscarem profissional habilitado e com competência profissional regulamentada para tal ou melhor esclarecer este objetivo.

Pendências: Obtenção de declaração do Instituto de Medicina do Sistema digestivo Ilha de Santa Catarina, reformulação do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido de acordo com a Resolução CNS 196/96, e maiores esclarecimentos da metodologia de pesquisa.

PARECER DO CEP

com pendência

Informamos que o parecer dos relatores foi aprovado por em reunião deste Comitê na data de 28 de maio de 2007.

VI- Data da Reunião: 28 de maio de 2007.

Washington Portela de Souza

Coordenador do CEP

Fonte: CONEP/ANVS - Resoluções 196/96 e 251/97 do CNS.

Tendo em vista o pronto atendimento das pendências, onde os pesquisadores prestaram os esclarecimentos solicitados e apresentaram a documentação pertinente, somos pela aprovação do presente projeto de pesquisa.

VII- PARECER FINAL:

aprovado

Informamos que o parecer dos relatores foi aprovado por em reunião deste Comitê na data de 25 de junho de 2007.

VIII- Data da Reunião: 25 de junho de 2007.



Prof. Washington Portela de Souza

Coordenador do CEP

Fonte: CONEP/ANVS - Resoluções 196/96 e 251/97 do CNS.

10 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDALLA, M. Y.; AHMAD, I. M.; SPITZ, D. R. *et al.* Hepatitis C virus-core and non structural proteins lead to different effects on cellular antioxidant defenses. **Journal Medicine Virology**. v.76, p. 489-497, 2005.

ABRAHAM, Z.; REZNICK & PACKER, L. Carbonyl Assays for determination of oxidatively modified proteins. **Methods in Enzymology**. v. 233, p. 357-363, 1994.

ACRAS, R. N.; PEDROSO, M. L. A.; CAUM, L. C. *et al.* A taxa de resposta sustentada da hepatite C crônica ao tratamento com os diversos interferons-alfa e ribavirinas distribuídos pelo Governo Brasileiro é semelhante à da literatura mundial. **Arquivos de Gastroenterologia**. v.41, n.1, p. 1097-2004, 2004.

AEBI, H. Catalase *in vitro*. **Methods in Enzymology**. v. 204, p., 234-254, 1984.

ALTER, H. J.; TEGTMEIER, G. E.; JETT, B. W. *et al.* The use of a recombinant immunoblot assay in the interpretation of anti-hepatitis C virus reactivity among prospectively followed patients, implicate donors, and random donors. **Transfusion**. v.31, n.8, p. 771-776, 1991.

ANGULO, P.; KEACH, J. C.; BATTS, K. P. *et al.* Independent predictors of liver fibrosis in patients with nonalcoholic steatohepatitis. **Hepatology**. v. 6, p. 1356-1362, 1999.

AUGUSTO, F. & LOBATO, C. Hepatite C. Augusto F & Lobato C. Hepatite C. In: **Hepatitis Víricas**. Ed. Núcleo de Gastroenterologia dos Hospitais Distritais. p. 22-130, 2004.

BARBOSA, E. R. D.; FAINTUCH, J.; MOREIRA, E. A. M. *et al.* Supplementation of vitamin E, C and zinc attenuates oxidative stress in burned children: a randomized, double-blind, placebo-controlled pilot study. **Journal of Burn Care & Research**. 2009.

BARZILAI, A. & YAMAMOTO, K-I. DNA damage response to oxidative stress. **DNA Repair**. v.3, p. 1109, 2004.

BERGER, M.M. Can oxidative damage be treated nutritionally? **Clinical Nutrition**. v.24, n.2, p.172-183, 2005.

BERGMEYER, H. U.; HØRDER, M. & REJ R. Approved recommendation (1985) on IFCC methods for the measurement of catalytic concentration of enzymes. Part 3. IFCC Method for alanine aminotransferase. **Journal Clinical Chemistry and Clinical Biochemistry**. v. 24, p.481-489, 1986.

BERRA, C. M. & MENCK, C. F. M. Estresse oxidativo, lesões no genoma e processos de sinalização no controle do ciclo celular. **Química Nova**. v. 29, n. 6, p. 1340-1344, 2006.

BERTOLETTI, A.; DÉLIOS, M. M.; BONI, C. *et al.* Different cytokine profile of intrahepatic T cells in chronic hepatitis B and hepatitis C virus infection. **Gastroenterology**. v.112, p. 132-139, 1997.

BEUTLER, E.; DURON, O.; KELLY, B. M. Improved method for the determination of blood glutathione. **The Journal of Laboratory Clinical Medicine**. v. 61, p. 882-890, 1963.

BHASKARAM, P. Micronutrient, malnutrition, infection and immunity: an overview. **Nutrition Reviews**. v.60, p. 40-45, 2002.

BIRD, R.P.; DRAPER, A.H. Comparative studies on different methods of malondyaldehyde determination. **Methods Enzymol**. v 90, p.105-110, 1984.

BOVERIS, A.; CADENAS, E. Production of superoxide dismutase radicals and hydrogen peroxide in mitochondria. In: OBERLEY, L.W. **Superoxide dismutase**, CRC:Boca Raton, v. 2, p. 159-168, 1982.

BOVERIS, A.; CADENAS, E. Cellular sources and steady-state levels of reactive oxygen species. In: CLERCK, L.; MASSARO, D. **Oxygen, Gene Expression and Cellular**, Marcel Dekker:New York, v. 105, p. 1-25, 1997.

BOWERS, G. N. & MCCOMB, R. B. A continuous spectrophotometric method for measuring the activity of serum alkaline phosphatase. **Clinical Chemistry**. v.12, p.70, 1966.

BOWLES, D.K.; TORGAN, C.E.; EBNER, S. Effect of acute, submaximal exercise on exercise on skeletal muscle vitamin E. **Free Radical Research Communications**. v.14, p.139-143, 1991.

BOYA, P.; PEÑA, A.; BELOQUI, O. *et al.* Antioxidant status and glutathione metabolism in peripheral blood mononuclear cells from patients with chronic hepatitis C. **Journal of Hepatology**. v.31, p. 808-814, 1999.

BRANDÃO, A. B. M.; FUCHS, S. C.; SILVA, M. A. A. *et al.* Diagnóstico da hepatite C na prática médica: revisão de literatura. **Revista Panamericana de Saúde Pública**. v.9, n.3, p. 161-168, 2001.

BRASIL. Secretaria de Vigilância em Saúde. Dispõe sobre o protocolo clínico e diretrizes terapêuticas para hepatite viral crônica C. **Portaria SAS/MS nº 863, de 04 de novembro de 2002**.

BRASIL. Secretaria de Vigilância em Saúde. Dispõe sobre o protocolo clínico e diretrizes terapêuticas para hepatite viral crônica C. **Portaria SAS/MS nº 34, de 28 de setembro de 2007**.

BRASS, V.; PAL, Z.; SAPAY, N. *et al.* Conserved determinants for membrane association of nonstructural protein 5A from hepatitis C virus and related viruses. **Journal of Virology**. v.81, n.6, p. 2745-2757, 2007.

BRIGELIUS-FLOHÉ, R. Vitamin E: The shrew waiting to be tamed. **Free Radical Biology & Medicine**. v. 46, p. 543-554, 2009.

CADET, J.; DOUKI, T.; GASPARUTTO, D. *et al.* Radiation-induced damage to cellular DNA: measurement and biological role. **Archives of Biochemistry and Biophysics**. v. 423, p. 23, 2004.

CALBERG, I.; MANNERVIK, B. Glutathione reductase from rat liver. **Methods Enzymology**. v. 113, p. 484-490, 1985.

CAMPIOTTO, S.; PINHO, J. R. R.; CARRILHO, F. J. *et al.* Geographic distribution of hepatitis C virus genotypes in Brazil. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. v. 38, p. 41-49, 2005.

CHANCE, B.; SIES, H. & BOVERIS, A. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. **Physiology Review**. v. 59, p. 527-602, 1979.

CHOI, J. & JAMES OU, -H. Mechanisms of liver injury: III Oxidative stress in the pathogenesis of hepatitis C virus. **American Journal of Physiology Gastrointestinal and Liver Physiology**. v. 290, p. 847-851, 2006.

CHOO, Q. L.; KNO, G.; WEINER, A. J. *et al.* Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. **Science**. v.244, p. 359-362, 1989.

CHROBOT, A. M.; SZCZEPANIK-SZAFLARSKA, A. & DREWA, G. Antioxidant defense in children with chronic viral hepatitis B and C. **Medicine Science Monitor: international medical journal of experimental and clinical research**. v. 6, n. 4, p. 713-718, 2000.

CHUNG, R.T.; ANDERSEN, J.; VOLBERDING, P. *et al.* Peginterferon alfa-2a plus ribavirin versus interferon alfa-2a plus ribavirin for chronic hepatitis C in HIV-coinfected persons. **New England Journal of Medicine**. v. 5, n. 351, p. 451-459, 2005.

CHUTAPUTTI A. Adverse effects and other safety aspects of the hepatitis C antivirals. **Journal of Gastroenterology and Hepatology**. 15 (Suppl.):E156-E163, 2000.

COCQUEREL, L.; VOISSET, C. & DUBUISSON, J. Hepatitis C virus entry: potential receptors and their biological functions. **Journal of General Virology**. v. 87, p. 1075-1084, 2006.

CONSENSO SOBRE CONDUTAS NAS HEPATITES VIRAIS B e C. Sociedade Brasileira de Hepatologia. São Paulo – SP, 2002.

CONSENSUS CONFERENCE- Treatment of hepatitis C. Paris, 2002.

CONTE, V. P. Hepatite crônica por vírus C: parte 2 – tratamento. **Arquivos de Gastroenterologia**. v. 37, n. 4, p. 235-242, 2000.

CORTESE, M. M.; SUSCHEK, C. V.; WETZEL, W. *et al.* Zinc protects endothelial cells from hydrogen peroxide via Nrf2-dependent stimulation of glutathione biosynthesis. **Free Radical Biology and Medicine**. v. 44, p. 2002-2012, 2008.

COSTA, R. M. A.; LIMA, W. C.; VOGEL, C. I. G. *et al.* **General Molecular Biology**. v. 24, p. 131, 2001.

COUROUCE, A. M.; NOEL, L.; BARIN, F. *et al.* A comparative evaluation of the sensitivity of five anti-hepatitis C virus immunoblot assays. **Vox Sanguinis**. v. 74, n. 4, p. 217-224, 1998.

CROFT, K.D. The chemistry and biological effects of flavonoids and phenolic acids. In: Towards Prolongation of Healthy Life Span. **New York Academy of Science**., v. 854, p. 435-443. 1998.

CROSS, C. E. & HALLIWELL, B. Oxygen-derived Species: Their relation to human disease and environmental stress. **Environmental Health Perspectives**. v. 102 (Suppl 10), p. 5-12, 1994.

DALLE-DONNE, I.; ROSSI, R.; GIUSTARINI, D. *et al.* Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. **Clinica Chimica Acta**. v. 329, p. 23-38, 2003.

DARDENE, M. Zinc and immune function. **European Journal of Clinical Nutrition**. v.56, p. 20-23, 2002.

DAVIS, G. L.; ESTEBAN-MUR, R.; RUSTIG, V. *et al.* Interferon alfa-2b alone or in combination with ribavirin for the treatment of relapse of chronic hepatitis C. International Hepatitis Interventional Therapy Group. **New England Journal of Medicine**. v. 339, p. 1493-1499, 1998.

DI BISCIGLIE, A. M. & HOOFNAGLE, J. H. Optimal therapy of hepatitis C. **Hepatology**. v. 36, n. 5 (Suppl. 1), p. 121S-127S, 2002.

DIKICI, I.; MEHMETOGLU, I.; DIKICI, N. *et al.* Investigation of oxidative stress and some antioxidants in patients with acute and chronic viral hepatitis B and the effect of interferon- α treatment. **Clinical Biochemistry**. v. 38, p. 1141-1144, 2005.

DIMITROV, N., MEYER, C., GILLILAND, D. *et al.* Plasma tocopherol concentration in response to supplemental vitamin E. **American Journal of Clinical Nutrition**., v. 53, p. 723-729, 1991.

DREHER, D. & JUNOD, A. Role of oxygen free radical in cancer development. **European Journal of Cancer**. v. 32, n. 1, p. 30-38, 1996.

DRÖGE, W. Free radicals in the physiological control of cell function. **Physiology Review**. v. 82, p. 47-95, 2002.

- DUBUISSON, J. Hepatitis C virus protein. **World Journal Gastroenterology**. v. 13, p. 2406-2415, 2007.
- EASL- International Consensus Conference on Hepatitis C. Paris, 26-28, 1999. Consensus Statement. European Association for Study of the Liver. **Journal of Hepatology**. v. 30, p. 956-961, 1999.
- EBELING, F.; LAPPALAINEN, M.; VUORISTO, M. *et al.* Factors predicting interferon treatment response in patients with chronic hepatitis C: late viral clearance does not preclude a sustained response. **American Journal of Gastroenterology**. v. 96, n. 4, p. 1237-1242, 2001.
- EPP, O.; LANDENSTEIN, R. & WENDEL, A. The refined structure of the selenoenzyme glutathione peroxidase at 0,2 nm resolution. **European Journal of Biochemistry**. v. 133, p. 51-69, 1983.
- EVANS, P. & HALLIWELL, B. Micronutrients: oxidant, antioxidant status. **The British of Journal Nutrition**. v.85, suppl. 2, p.S67-S74, 2001.
- EVANS, M. D.; COOKE, M. S. Factors contributing to the outcome of oxidative damage to nucleic acids. **Bioassays**. v. 26, p. 533-542, 2004.
- FARCI, P.; SHINDA, P; COIANA, A. *et al.* The outcome of acute hepatitis C predicted by the evolution of the viral quasispecies. **Science**. v. 288, p. 339-344, 2000.
- FERREIRA, A. L. A. & MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**. v. 43, p. 61-68, 1997.
- FLOHÉ, L.; GUNZLER, W.A. Assays of glutathione peroxidase. **Methods Enzymology**. v. 105, p. 114-121, 1984.
- FONTANA, R. J.; ISRAEL, J.; LECLAIR, P. *et al.* Iron reduction before and during interferon therapy of chronic hepatitis C: Results of a multicenter, randomized, controlled trial. **Hepatology**. v. 3, p. 730-736, 2000.
- FORNEK, J. L.; TYGRET, L. T.; WADSMIDT, T. J. *et al.* Critical role for STAT-3 in T-dependent terminal differentiation of IgG B cells. **Blood**. v. 107, p. 1085-1091, 2006.
- FRANÇOIS, C.; DUVERLIE, G.; REBOUILLAT, D. *et al.* **Journal of Virology**. v. 74, p. 5587-5596, 2000.
- FREEMAN, A. J.; DORE, G. J.; LAW, M. G. *et al.* Estimating progression to cirrhosis in chronic hepatitis C virus infection. **Hepatology**. v. 34, n. 4, p. 809-816, 2001.
- FRIED, M. W.; SHIFFMAN, M. L.; REDDY, K. R. *et al.* Peginterferon alfa-2a plus ribavirin for chronic hepatitis C virus infection. **New England Journal of Medicine**. v. 347, p. 975-982, 2002.
- FRIEDMAN, P.A. & ZELDEL, M.L. Victory at C. **Nature Medicine**. v. 5, n. 6, p. 620-621, 1999.
- FRIEDMAN, S. L. Liver fibrosis – from bench to bedside. **Journal of Hepatology**. v. 38, p. 38-53, 2003. Supplement 1.
- FRIDOVICH, I. Superoxide and evolution. **Horizons in Biochemistry and Biophysics**. p. 1-37, 1974.
- FRIDOVICH, I. Oxygen toxicity: a radical explanation. **The Journal of Experimental Biology**. v. 201, p. 1203-1209, 1997.
- GALE, M.; BLAKELY, S. M.; KWIECISZEWSKI, B. *et al.* Control of PKR protein kinase by hepatitis C virus nonstructural 5A protein: molecular mechanisms of kinase regulation. **Molecular and Cellular Biology**.v. 18, p. 5208-5218, 1998.

GATÉ, L.; PAUL, J.; NGUYEN B, G. *et al.* Oxidative stress induced in pathologies: the role of antioxidants. **Biomedicine & Pharmacotherapy**. v. 53, p. 169-180, 1999.

GAYOTTO, L. C. Sociedade Brasileira de Hepatologia. Visão História e Consenso Nacional sobre a classificação das hepatites crônicas. **GED**. v. 19, n. 3, p. 137-40, 2002.

GELLA, F. J.; OLIVELLA, T.; CRUZ PASTOR, M. *et al.* A simple procedure for routine determination of aspartate aminotransferase and alanine aminotransferase with pyridoxal phosphate. **Clinical Chemistry Acta**. v. 153, p. 241-247, 1985.

GHOSH, A.; STEELE, R.; MEYER, K. *et al.* Hepatitis C virus NS5A protein modulates cell cycle regulatory genes and promotes cell growth. **The Journal of General Virology**. v. 80, p. 1179-1183, 1999.

GIANNINI, E. G.; MASTRACCI, L.; BOTTA, F. *et al.* Liver iron accumulation in chronic hepatitis C patients without HFE mutations: relationships with histological damage, viral load and genotype an alpha-glutathione S-transferase level. **European Journal Gastroenterology & Hepatology**. v. 13, p. 1355-1361, 2001.

GIANNINI, E. G.; RISSO, D.; BOTTA, F. *et al.* Validity and clinical utility of the aspartate aminotransferase-alanine aminotransferase ratio in assessing disease severity and prognosis in patients with hepatitis C virus-related chronic liver disease. **Archives of Internal Medicine**. v. 163, p. 134-146, 2003.

GIANNINI, E. G.; TESTA, R. & SAVARINO, V. Liver Enzyme alteration: a guide for clinicians. **Canadian Medical Association of its Licensors**. v. 3, p. 172, 2005.

GIBSON, R. S. **Principles of Nutritional Assessment**. New York: Oxford University, p. 543-553, 1990.

GOCHEE, P. A.; JONSSON, J. R.; CLOUSTON, A. D. *et al.* Steatosis in chronic hepatitis C: association with increased messenger RNA expression of collagen I, tumor necrosis factor-alpha and cytochrome P450 2E1. **Journal of Gastroenterology Hepatology**. v. 18, p. 386-392, 2003.

GOLDBLUM, S.E.; WU, K.M.; JAY, M. Lung myeloperoxidase as a measure of pulmonary leukostasis in rabbits. **Journal of Applied Physiology**. v. 59(6), p. 1978-85, 1985.

GOMEZ, E. V.; ORAMAS, B. G.; SOLER, E. A. *et al.* Viusid, anutritional supplement, in combination with interferon α -2b and ribavirin in patients with chronic hepatitis C. **Liver International**. p. 247-259, 2007.

GONZALES-PERALTA, R. P. & LAU, J. Y. N. Pathogenic mechanisms for hepatocellular damage in chronic hepatitis C virus infection. **Seminars in Gastroenterology**. v. 6, p. 28-34, 1994.

GOODE, H.F.; COWLEY, H.C. & WALER, B.E. Decrease antioxidant status and peroxidation in patient with septic shock and secondary organ dysfunction. **Critical Care Medicine**. v. 23, p. 646-651, 1995.

GRETCH, D. R.; WILSON, J. J.; CARITHERS, Jr R. L. *et al.* Detection of hepatitis C virus RNA: Comparison of one-stage polymerase chain reaction (PCR) with nested-set PCR. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 31, n. 2, p. 289-291, 1993.

GRETCH, D. R.; CORAZON dela ROSA, M. T.; CARITHERS, Jr R. L. *et al.* Assessment of hepatitis C viremia using molecular amplification technologies: correlations and clinical implications. **Annals of Internal Medicine**. v. 123, n. 5, p. 321-329, 1995.

GRIENGLING, K.K. & FITZGERALD, G.A. Oxidative stress and cardiovascular injury, Part I: Basic mechanisms and in vivo monitoring of ROS. **Circulation**. v. 108, p. 1912-1916, 2003.

GRONBAEK, K.; FRIIS, H. B.; HANSEN, M. C. *et al.* The effect of antioxidant supplementation on hepatitis C viral load, transaminases and oxidative status: a randomized trial among chronic hepatitis C virus-infected patients. **European Journal of Gastroenterology & Hepatology**. v. 18, n. 9, p. 985-989, 2006.

GUTTERIDGE, J.M.C. & HALLIWELL, B. The measurement and mechanism of lipidperoxidation in biological systems. **Trends in Biochemical Sciences**. v. 15, p. 129-135, 1990.

HABER, M. M.; WEST, A. B.; PATH, M. R. C. *et al.* Relationship of aminotransferases to liver histological status in chronic hepatitis C. **The American Journal of Gastroenterology**. v. 90, p. 1250-1257, 1995.

HABIG, W.H.; PABST, M.J. & JACOBY, W.B. Glutathione S-transferases: the first enzymatic step in mercapturic acid formation. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 249, p. 7130-7139, 1976.

HADZIYANNIS, S. J.; SETTE, H.; MORGAN, T. R. *et al.* Peginterferon- α 2a and ribavirin combination therapy in chronic hepatitis C: a randomized study of treatment duration and ribavirin dose. **Annals of Internal Medicine**. v. 140, p. 346-355, 2004.

HALLIWELL, B. & GUTTERIDGE, J.M.C. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. **Methods Enzymology**. v. 186, p. 1-85, 1990.

HALLIWELL, B. & GUTTERIDGE, J.M.C. **Free Radicals in Biology and Medicine**. ed. 4. Oxford: Clarendon Press, 2006.

HARRIS, J. & BENEDICT, F. A biometric study of basal metabolism in man. **Washington D.C.** Carnegie Institute of Washington, 1919.

HAWKINS, C. L. & DAVIES, M. J. Generation and propagation of radical reactions on proteins. **Biochimica et biophysica acta**. v. 1504, p. 196-219, 2001.

HINO, K.; MURAKAMI, Y.; NAGAI, A. *et al.* 417-2 α -Tocopherol and ascorbic acid attenuates the ribavirin-induced decrease of eicosapentaenoic acid in erythrocyte membrane in chronic hepatitis C patients. **Hepatology**. v. 21, n. 8, p. 1269-75, 2006.

HIRANO, T.; ISHIHARA, K. & HIBI, M. Roles of STAT-3 in mediating the cell growth, differentiation and survival signals relayed through the IL-6 family of cytokine receptors. **Oncogene**. v. 19, p. 2548-2556, 2000.

HOOFNAGLE, J. H. Hepatitis C: the clinical spectrum of disease. **Hepatology**. v. 26 (S-1), p. 15-20, 1997.

HOUGHTON, M. Strategies and prospects for vaccination against the hepatitis C viruses. **Current Topics in Microbiology and Immunology**. v. 242, p. 327-339, 2000.

HUNT, J. R. Position of the American Dietetic Association: vitamin and mineral supplementation. **Journal of the American Dietetic Association**. Chicago, v. 96, n.1, p. 73-77, 1996.

IFCC Methods for the Measurement of Catalytic Concentration of Enzymes- Part 4. IFCC Method for γ -Glutamyltransferase. **Journal of Clinical Chemistry and Clinical Biochemistry**. v. 21, p. 633-645, 1983.

IFCC - Approved recommendations (1985) on IFCC Methods for the Measurement of Catalytic Concentration of Enzymes. Part 2: IFCC Method for

Aspartate Aminotransferase (EC 2.6.1.1). **Journal Clinical Chemistry and Clinical Biochemistry**. v. 24, p.497-510, 1986.

IMBERT-BISMUT, F.; RATZIU, V.; PIERONI, L. *et al.* Biochemical markers of liver fibrosis in patients C virus infection: a prospective study. **Lancet**. v. 357, p. 1069-1075, 2001.

ISHII, Y.; PARTRIDGE, C.A.; DEL VECCHIO, P.J. *et al.* Tumor necrosis factor- α -mediated decrease in glutathione increase the sensitivity of pulmonary vascular endothelial cells to H₂O₂. **Journal Clinical Investigation**. v. 89, p. 794-802, 1992.

JACOB, R. A. Vitamina C. In: SHILS, HABIG, W.H.; PABST, M.J.; JACOBY, W.B. Glutathione S-transferases: the first enzymatic step in mercapturic acid formation. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 249, p. 7130-7139, 1976.

JACOB, R. A. Vitamina C. In: SHILS, M.E. **Tratado de nutrição moderna na saúde e na doença**. ed. 2. São Paulo: Atheneu. p. 349-517, 2003.

JACOB, K.; PERIAGO, M. J.; BÖHM, V. *et al.* Influence of lycopene and vitamin C from tomate juice on biomarkers of oxidative stress and inflammation. **Bristish Journal of Nutrition**. v. 99, p. 137-146, 2008.

JANSEN, S. J. K. Oxidative stress and free radicals. **Journal of Molecular Structure**. v. 666, n.1/2, p. 387-392, 2003.

JEROME, K. R. & GRETCH, D. R. Laboratory approaches to the diagnosis of hepatitis C virus infection. **Minerva Gastroenterologica e Dietologica**. v. 50, n. 1, p. 9-20, 2004.

JIALAL, I. & DEVARAJ, S. Antioxidants and atherosclerosis: don't throw out the baby with the bath water. **Circulation**. v. 107, p. 926-928, 2003.

JOHANSSON, S. A. E.; CAMPBELL, J. L. & MALMQVIST, K. G. Particle-Induced X-Ray Emission Spectrometry (PIXE). **John Wiley & Sons**, Inc.; 1995.

JONES, D.P.; EKLOW, L.; THOR, H. *et al.* Metabolism of hydrogen peroxide in isolated hepatocytes: relative contributions of catalase and glutathione peroxidase in decomposition of endogenously generated H₂O₂. **Archives of Biochemistry and Biophysics**. v. 210, p. 505-516, 1981.

KAPPUS, H. & DIPLOCK, A. T. Tolerance and safety of vitamin E: a toxicological position report. **Free Radical Biology and Medicine**. v. 13, p. 55-74, 1992.

KATO, N.; KENG-HSIN, L. & ONO-NITA, S. **Journal of Virology**. v. 71, p. 8856-8859, 1997.

KIM, K. S.; KANG, K. W.; SEU, Y. B. *et al.* Interferon- γ induces cellular senescence through p53-dependent DNA damage signaling in human endothelial cells. **Mechanisms of Ageing and Development**. v. 04, n. 11, p. 1-10, 2008.

KING, J.C.; KEEN, C. Zinco. In: SHILS, M.E. **Tratado de nutrição moderna na saúde e na doença**. ed. 2. São Paulo: Atheneu. p. 239 –256, 2003.

KITTS, D.D. An evaluation of the multiple effects of the antioxidant vitamins. **Trends in Food Science Technology**. v. 8, p. 198-203, 1997.

KO, W-S.; GUO, C-H.; YEH, M-S. *et al.* Blood micronutrient, oxidative stress, and viral load in patients with chronic hepatitis C. **World Journal Gastroenterology**. v. 11, n. 30, p. 4697-4702, 2005.

KÖKEN, T.; SERTESER, M.; KAHRAMAN, A. *et al.* Oxidative stress markers in hepatitis C infected hemodialysis patients. **Journal Nephrology**. v. 15, p. 302-307, 2002.

KOLYKHALV, A. A.; AGAPOV, E. V.; BLIGHT, K.J. *et al.* Transmission of hepatitis C by intrahepatic inoculation with transcribed RNA. **Science**. v. 277, p. 570-574, 1997.

KOPPEL, E. A.; van GISBERGEN, K. P. J. M.; GEIJTENBEEK, T. B. H. *et al.* Distinct functions of DC-SIGN and its homologues L-SIGN (DC-SIGNR) and mSIGNR1 in pathogen recognition and immune regulation. **Cell Microbiology**. v. 7, p. 157-165, 2005.

KORENAGA, M.; WANG, T.; LI, Y. *et al.* Hepatitis C virus core protein inhibits mitochondrial electron transport and increases reactive oxygen species. **Journal of Biological Chemistry**. v. 280, n. 45, p. 37481-37488, 2005.

KORTH, M. J. & KATZE, M. G. Evading the interferon response: hepatitis C virus and the interferon-induced protein Kinase, PKR. **Current Topics in Microbiology and Immunology**. v. 24, p. 197-224, 2000.

KRISHNA, S. S.; MAMJUMBAR, I. & GRISHIN, N. V. Structural classification of zinc fingers. **Nucleic Acids Research**. v. 31, p. 532-550, 2003.

LAMONACA, V.; MISSALE, G.; URBANI, S. *et al.* Conserved hepatitis C virus sequences are highly immunogenic for CD4⁺ T cells: implications for vaccine development. **Hepatology**. v. 30, p. 1088-1098, 1999.

LATHA, B. & BABU, M. The involvement of free radicals in burn injury: a review. **Burns**. v. 27, p. 309-317, 2001.

LEITE, H.P. & SARNI, R.S. Radicais livres, antioxidantes e nutrição. **Revista Brasileira de Nutrição Clínica**. v. 18, n. 2, p. 60-65, 2003.

LEE, D. H.; BLOMHOFF, R. & JACOBS JR, D. R. Is serum gamma-glutamyltransferase a marker of oxidative stress? **Free Radical Research**. v. 38, n. 6, p. 535-539, 2004.

LEVENT, G.; ALI, A. & AHMET, A. *et al.* Oxidative stress and antioxidant defense in patients with chronic hepatitis C before and after pegylated interferon alfa-2b plus ribavirin therapy. **Journal of Translational Medicine**. v. 4, n. 25, p. 1-6, 2006.

LIM, J. S.; YANG, J. H.; CHUN, B. Y. *et al.* Is serum γ -glutamyltransferase inversely associated with serum antioxidants as a marker of oxidative stress? **Free Radical Biology and Medicine**. v. 37, n. 7, p. 1018-1023, 2004.

LIMA, M. A. M. & SERRA, M. C. V. F. Novo enfoque no tratamento nutricional da queimadura. **Revista Brasileira de Queimados**. v. 2, n. 1, p. 62-64, 2002.

LIU, T. Z.; LEE, K. T.; CHERN, C. L. *et al.* Free radical-triggered hepatic injury of experimental obstructive jaundice of rats involves overproduction of proinflammatory cytokines and enhanced activation of nuclear factor kappaB. **Annals of Clinical and Laboratory Science**. v. 31, p. 383-390, 2001.

LOGUERCIO, C. & FEDERICO, A. Oxidative stress in viral and alcoholic hepatitis. **Free Radical Biology and Medicine**. v. 34, p. 1-10, 2003.

LOWRY, O. H.; ROSENBROUGH, N. J.; AL, F. *et al.* Protein measurement using the folin phenol reagent. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 193, p. 265-275, 1951.

LU, G.; SHIMIZU, I.; CUI, X. *et al.* Interferon-alpha enhances biological defense activities against oxidative stress in cultured rat hepatocytes and hepatic stellate cells. **The Journal of Medical Investigation**. v. 49, p. 172-181, 2002.

LYKKESFELDT, J.; LOFT, S. & POULSEN, H. E. Determination of ascorbic acid and dehydroascorbic acid in plasma by High- Performance Liquid Chromatography with coulometric detection – Are they reliable biomarkers of oxidative stress? **Analytical Biochemistry**. v. 229, p. 329-335, 1995.

MAÇAO, L. B.; WILHELM FILHO, D.; PEDROSA, R. C. *et al.* Antioxidant therapy attenuates oxidative stress in chronic cardiopathy associated with Chagas' disease. **International Journal of Cardiology**. v. 123, p.43-49, 2007.

MACHIDA, A.; OHNUMA, H.; TSUDA, F. *et al.* Two distinct subtypes of hepatitis C virus defined by antibodies direct to the putative core protein. **Hepatology**. v. 16, n. 4, p. 886-891, 1992.

MACHIDA, K.; CHENG, K. T.-H.; LAI, C.-K. *et al.* Hepatitis C virus triggers mitochondrial permeability transition with production of reactive oxygen species, leading to DNA damage and STAT-3 activation. **Journal of Virology**. v. 80, n.14, p. 7199-7207, 2006.

MAGHIT, M. B.; GOULDABLE, J.; DALMAS, E. *et al.* Time course of oxidative stress after major burns. **Intensive Care Medicine**. v. 26, p.800-803, 2000.

MAJUMDAR, M.; GHOSH, A.; STEELE, R. *et al.* **Journal of Virology**. v. 75, p. 1401, 2001.

MANNS, M. P.; McHUTCHISON, J. G.; GORDON, S. C. *et al.* Peginterferon alfa-2b plus ribavirin compared with interferon alfa-2b plus ribavirin for initial treatment of chronic hepatitis C: a randomized trial. **Lancet**. v. 358, p. 958-965, 2001.

MARCELINN, P. *et al.* Fibrous and disease progression in hepatitis C. **Hepatology**. v. 36, p. 847-856, 2002.

MARCELINN, P.; BOYER, N.; GERVAIS, A. *et al.* Long-term histologic improvement and loss of detectable intrahepatic HCV RNA in patients with chronic hepatitis C and sustained response to interferon-alpha therapy. **Annals of Internal Medicine**. v.127, p. 875-881, 1997.

MARET, W. The function of zinc metallothionein: a link between cellular zinc and redox state. **The Journal of Nutrition**. v. 22 (Suppl.), p. 1455S-1458S, 2000.

MCCORD, J. M. & FRIDOVICH, I. The reduction of cytochrome c by milk xanthine oxidase. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 243, p. 5723, 1969.

MEDEIROS-FILHO, J. E. M.; NEUMANN, A. U.; PINHO, J. R. *et al.* IFN- α dosing frequency and HCV genotype affect early viral kinetics more than addition of ribavirin. **Anais VII International Symposium on Hepatitis C and Related viruses**. Sydney, Austrália, 2000.

MELNYK, S.; POGRIBNA, M.; POGRIBNY, I. *et al.* A new HPLC method for the simultaneous determination of oxidized and reduced plasma amino thiols using coulometric electrochemical detection. **Journal Nutrition Biochemical**. v. 10, p. 490-497, 1999.

MINGJIAN, Z.; QIFANG, W.; LANXING, G. *et al.* Comparative observation of the changes in serum lipid peroxides influenced by the supplementation of vitamin E in burn patients and healthy controls. **Burns**. v. 18, n. 1, p. 19-21, 1992.

MISRA, H. P. & FRIDOVICH, I. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 247, p. 188-192, 1972.

MONCADA, S. & ERUSALIMSKY, J. D. Does nitric oxide modulate mitochondrial energy generation and apoptosis? **Nature Reviews Molecular Cell Biology**. v. 3, p. 214-220, 2002.

MOREL, I.; ABALEA, V.; CILLARD, P. *et al.* Repair of oxidized DNA by flavonoid myricetin. **Methods in Enzymology**. v. 335, p. 308-316, 2001.

MURAKAMI, Y.; NAGAI, A.; KAWAKAMI, T. *et al.* Vitamin E and C supplementation prevents decrease of eicosapentanoic acid in mononuclear cells in chronic hepatitis C patients during combination therapy of interferon α -2b and ribavirin. **Nutrition**. v. 22, p. 114-122, 2006.

MUSTACICH, D. J.; VO, A. T.; ELIAS, V. D. *et al.* Regulatory mechanisms to control tissue α -tocopherol. **Free Radical Biology & Medicine**. v. 43, p. 610-618, 2007.

NAGATA, S. Apoptotic DNA fragmentation. **Experimental Cell Research**. v. 256, n. 1, p. 12-18, 2000.

NAKATSUJI, Y.; MATSUMOTO, A.; TANAKA, K. *et al.* Detection of chronic hepatitis C virus infection by four diagnostic systems: first-generation and second-generation enzyme-linked immunosorbent assay, second-generation recombinant immunoblot assay and nested polymerase chain reaction analysis. **Hepatology**. v. 16, n. 2, p. 300-305, 1992.

NATHENS, A. V.; NEFF, M. J. & JURKOVICH, G. J. Randomized, prospective trial of antioxidant supplementation in critically ill surgical patients. **Annals of Surgery**. v. 236, n. 6, p.814-822, 2002.

National Academic Science - DRI s. Disponível em: www.nap.edu. Acesso: em 12/01/2007.

NELSON, D. R. The immunopathogenesis of hepatitis C virus infection. **Clinics in Liver Disease**. v. 5, n. 4, p. 931-953, 2001.

NEBERT, D. W.; AMY, R. L.; MATTEW, D. Z. *et al.* Role of the aromatic hydrocarbon receptor and (Ah) gene battery in the oxidative stress response, cell cycle control and apoptosis. **Biochemical Pharmacology**. v. 59, p. 65-85, 2000.

NHI (NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH). National Institutes of Health Consensus Development Conference statement: management of hepatitis C. **Hepatology**. v. 36 (Suppl. 1), p. 2S-20S, 2002.

NICOLETTI, G.; CRESCIBENE, L.; SCORNAIENCHI, M. *et al.* Plasma levels of vitamin E in Parkinson's disease. **Archives of Gerontology and Geriatrics**. v. 37, p. 7-12, 2001.

NORDBERG, J.; ARNÉR, E. S. J. Reactive oxygen species antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. **Free Radical Biology and Medicine**. v. 31, n. 11, p. 1287-1312, 2001.

OKAMOTO, H. S.; OKADA, Y.; SUGIYAMA, S. *et al.* The 5'-terminal sequence of the hepatitis C virus genome. **The Journal of Experimental Medicine**. v. 60, p. 167-177, 1990.

OKAMOTO, H. S.; OKADA, Y.; SUGIYAMA, S. *et al.* Typing hepatitis C virus by polymerase chain reaction with type-specific primers: application to clinical surveys and tracing infectious sources. **The Journal of General Virology**. v. 73, p. 673-679, 1992.

OKUDA, M.; LI, K.; BEARD, M. R. *et al.* Mitochondrial injury, oxidative stress, and antioxidant gene expression are induced by hepatitis C virus core protein. **Gastroenterology**. v. 122, p. 366-375, 2002.

OLIVEIRA Jr, E. A. B. **Alpha glutationa S-Transferase: marcador de lesão hepática em pacientes com hepatite pelo vírus C?** 2004. 148 f. Tese – Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. São Paulo, 2004.

OLIVEIRA, T. B.; PEDROSA, R. C. & WILHELM FILHO, D. Oxidative stress in chronic cardiopathy associated with Chagas' disease. **International Journal of Cardiology**. v. 116, p. 357– 363, 2007.

ONOSAKA, S.; TETSUCHIKAWAHARA, N.; MIN, K. Paradigm shift in zinc: metal pathology. **The Tohoku Journal of Experimental Medicine**. v. 196, p. 1-7, 2002.

OTSUKA, M.; KATO, N.; LAN, K. *et al.* Hepatitis C virus core protein enhances p53 function through augmentation of DNA binding affinity and transcriptional ability. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 275, p. 34122-34130, 2000.

PALACE, V. P.; MATEHWSKI, H. S. & KLAVERKAMP, J. F. Effects of sampling and storage conditions on the stability of biochemical parameters measured in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) liver. **Comparative Biochemistry and Physiology**. v. 95, p. 51-55, 1990.

PAPAS, A.M. Diet and antioxidant status. **Food and Chemical Toxicology**. v. 37, n. 9-10, p. 999-1007, 1999.

PARK, G. G-H.; LIN, B. P. C.; NGU, M. C. *et al.* Aspartate aminotransferase: alanine aminotransferases ratio in chronic hepatitis C infection: is it a useful predictor of cirrhosis? **Journal of Gastroenterology & Hepatology**. v. 15, p. 386-390, 2000.

PAWLOTSKY, J-M.; LONJON, I. & HEZODE, C. What strategy should be used for diagnosis of hepatitis C virus infection in clinical laboratories? **Hepatology**. v. 27, n. 6, p. 1700-1702, 1998.

PETERS, M. Mechanism of action of interferon. **Seminars Liver Disease**. v. 9, p. 235-239, 1989.

PETERS, M. Role of immune response in HCV. In: Lau JYN. **Hepatitis C protocols**. New Jersey: Humana Press. p. 407-411, 1998.

PHELPS, D. T.; FERRO, T. J.; HIGGINS, P. J. *et al.* TNF- α induces peroxynitrite-mediated depletion of lung endothelial glutathione via protein kinase C. **The American Journal of Physiology**. v. 269, p. L551-L559, 1995.

POLJSKAK, B.; GAZDAG, Z.; PESTI, M. *et al.* Pro-oxidative versus antioxidative reactions between Trolox and Cr (VI): the role of H₂O₂. **Environmental Toxicology and Pharmacology**. v.22, p. 15-19, 2005.

POYNARD, T.; MARCELLIN, P.; LEE, S. S. *et al.* Randomised trial of interferon alpha-2b plus ribavirin for 48 weeks or for 24 weeks versus interferon alpha-2b plus placebo for 48 weeks for treatment of chronic infection with hepatitis C virus. **Lancet**. v. 352, p. 1426-1432, 1998.

POWELL, S.R. The antioxidant properties of in. **Journal of Nutrition**. v. 130 (Suppl. 5S), p. 1147S-1454S, 2000.

PRELACK, K. & SHERIDAN, R. Micronutrient supplementation in the critically ill patients: Strategies for Clinical Practice. **Journal of Trauma**, v. 51, p. 601-620, 2001.

PRINCE, A. M.; BROTMAN, B.; GRADY, G. F. *et al.* Long-incubation post-transfusion hepatitis without serological evidence of exposure to hepatitis c virus. **Lancet**. v. 2, p. 241-246, 1974.

PRYOR, W.A. Oxy-radicals and related species: their formation, lifetimes and reactions. **Annual Review of Physiology**. v. 48, p. 657-667, 1986.

PRYOR, W.A. Vitamin E and heart disease: Basic science to clinical intervention trials. **Free Radical Biology and Medicine**. v. 28, p. 141-164, 2000.

PYRSOPOULOS, N. & REDDY, K. R. Extrahepatic Manifestations of Chronic Viral Hepatitis. **Current Gastroenterology Reports**. v. 3, p.71-78, 2001.

QADRI, I.; IWAHASHI, M.; CAPASSO, J. M. *et al.* Induced oxidative stress and activated expression of manganese superoxide dismutase during hepatitis C virus replication: role of JNK, p38 MAPK and AP-1. **Journal of Biochemistry**. v. 378, p. 919-928, 2004.

RADHAKRISHNAN, R.; WALTER, L. J.; HRUZA, A. *et al.* Zinc mediated dimmer of human interferon-alpha2b revealed by X-ray crystallography. **Structure**. v. 4, p. 1453-1463, 1996.

RAO, T. S.; CURRIE, J. L.; SHAFFER, A. F. *et al.* Comparative evaluation of arachidonic acid (AA)- and tetradecanoylphorbol acetate (TPA)- induced dermal inflammation. **Inflammation** v. 17, p. 723-741, 1993.

REHERMANN, B. & CHIRASI, F. V. Cell mediated immune response to the hepatitis C virus. **Current Topics in Microbiology and Immunology**. v. 242, p. 299-325, 2000.

RIBEIRO, C. M. **Efeito do Tratamento do Benzonidazol e da Terapia Antioxidante na Cardiopatia Chagásica Crônica**. 2009. 111f. Dissertação – Pós-Graduação em Farmácia – Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 2009.

RIBEIRO, S. M. R.; QUEIROZ, J. H.; PELÚZO, M. C. G. *et al.* A formação e os efeitos das espécies reativas de oxigênio no meio biológico. **Journal of Biosciences**. Uberlândia. v. 21, n. 3, p. 133-149, 2005.

SIES, H & STAHL, W. Vitamins E and C, beta carotene, and other carotenoids as antioxidants. **American Journal of Clinical Nutrition**. v. 62, n. 6, p. 1315S-1321S, 1997.

RODRIGUES-LUNA, H. & DOUGLAS, D. D. Natural history of hepatitis C following liver transplantation. **Current Opinion in Infectious Diseases**. v. 17, n. 4, p. 363-371, 2004.

ROSTAN, E.F.; DEBUYS, H.V.; MADEY, D.L. *et al.* Evidence supporting zinc as an important antioxidant for skin. **International Journal of Dermatology**. v. 41, n. 9, p. 606-611, 2002.

ROUSSELOT, B. D.; RATZIU, V.; GIRAL, P. *et al.* Blood oxidative stress markers are unreliable markers of hepatic steatosis. **Alimentary Pharmacology & Therapeutics**. v. 23, p. 91-98, 2006.

ROVER JÚNIOR, L.; HOEHR, N. F.; VELLASCO, A. P. *et al.* Sistema antioxidante envolvendo o ciclo metabólico da glutatona associado a métodos eletroanalíticos na avaliação do estresse oxidativo. **Química Nova**. v. 24, n. 1, p. 112-119, 2001.

SAGARA, Y.; DARGUSCH, R.; CHAMBERS, D. *et al.* Cellular mechanisms of resistance to chronic oxidative stress. **Free Radical Biology and Medicine**. v. 24, p. 1375-1389, 1998.

SCHIFF, E. R.; MEDINA, M. & KAHN, R. S. New perspectives in the diagnosis of hepatitis C. **Seminars in Liver Diseases**. v. 19(Suppl. 1):3-15, 2000.

SCHUMANN, G. *et al.* IFCC Primary Reference Procedures for the Measurement of Catalytic Activity Concentrations of Enzymes at 37°C. Part 6. Reference Procedure for the Measurement of Catalytic Concentration of g-Glutamyltransferase. **Clinical Chemistry Laboratory Medicine**. v. 40, p.734-8, 2002.

SCHWEDHELM, E.; MAAS, R.; TROOST, R. *et al.* Clinical pharmacokinetics of antioxidants and their impact on systemic oxidative stress. **Clinical Pharmacokinetics**. v. 42, p. 437-459, 2003.

SCHWER, B.; REN, S.; PIETSCHMANN, T. *et al.* Targeting of hepatitis C virus core protein to mitochondrial through a novel C-terminal localization motif. **Journal of Virology**. v. 78, p. 7958-7968, 2004.

SEREJO, F.; EMERIT, I.; FILIPE, P.M. *et al.* Oxidative stress in chronic hepatitis C: the effect of interferon therapy and correlation with pathological features. **Canadian Journal of Gastroenterology**. v. 17, p. 644-650, 2003.

SERONELLO, S., SHEIKH, M. & CHOI, J. Redox regulation of hepatitis C in nonalcoholic and alcoholic liver. **Free Radical Biology and Medicine**. v. 43, p. 869-882, 2007.

SIES, H. Oxidative stress: introductory remarks. In: SIES, H. **Oxidative Stress**, Ed. Academic press, USA, p. 1-7, 1985.

SIES, H. Oxidative Stress. **Oxidants and Antioxidants**. Academic Press, p.650, 1991.

SIES, H. Strategies of antioxidant defence. Review. **European Journal of Biochemistry**, Berlin. v. 215, n. 2, p. 213- 219, 1993.

SILVA, S. O. **Oxidação de melatonina catalisada por mieloperoxidase em neutrófilos ativados**. Universidade Federal de São Paulo: Dissertação de Mestrado, 2001.

SILVA, C. R. M. & NAVES, M. M. V. Suplementação de vitaminas na prevenção do câncer. **Revista de Nutrição**. v. 14, n. 2, 2001.

SIMMONDS, P.; MISHRA, F.; YAP, P. L. *et al.* Sequence variability in the 5' non-coding region of hepatitis c virus: identification of a new virus type and restrictions on sequence diversity. **Journal of General Virology**. v. 74, p. 661-668, 1993.

SORG, O. Oxidative stress: a theoretical model or a biological reality? **Comptes Rendus Biologies**. v. 327, n. 7, p. 649-662, 2004.

SOYLU, A. R.; AYDOĞDU, N.; BASARAN, U. N. *et al.* Antioxidants vitamin E and C attenuate hepatic fibrosis in biliary-obstructed rats. **World Journal Gastroenterology**. n. 12, v. 42, p. 6835-6841, 2006.

STAUB, H. L. Vírus da hepatite, manifestações sistêmicas e o reumatologista. **Revista Brasileira de Reumatologia**. v. 38, n. 3, p. 139-146, 1998.

STRAUSS, E. Hepatite C. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v. 34, n. 1, p. 69-82, 2001.

SUNTRES, Z. E. & LUI, E. M. Antioxidant effect of zinc and zinc-metallothionein in the acute cytotoxicity of hydrogen peroxide in Ehrlich ascites tumour cells. **Chemico – biological interactions**. v. 162, p. 11-23, 2006.

SUZUKI, H.; TAKAGI, H.; SOHARA, N. *et al.* Triple therapy of interferon and ribavirin with zinc supplementation for patients with chronic hepatitis C: A randomized controlled clinical trial. **World Journal of Gastroenterology**. v. 12, n. 8, p. 1265-1269, 2006.

TAKAGI, H.; NAGAMINE, T.; ABE, H. *et al.* Zinc supplementation enhances the response to interferon therapy in patients with chronic hepatitis C. **Journal of Viral Hepatitis**. v. 8, p. 367-371, 2001.

TAPIEIRO, H.; TEW, K.D. Trace elements in human physiology and pathology: zinc and metallothioneins. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v.57, p.399S-411S, 2003.

TARDIFF, K. D.; WARIS, G.; SIDDIQUI, A. Hepatitis C virus, ER stress and oxidative stress. **Trends Microbiology**. v. 13, p. 159-163, 2005.

THOMAS, J.A. Estresse oxidativo e defesa contra antioxidantes. In: SHILS, M.E.; OLSON, J.A.; SHIKE, M; ROSS, A.C. **Tratado de nutrição moderna na saúde e na doença**. ed. 9. São Paulo: Manole. p.801-812, 2003.

THORÉN, F.; ROMERO, A.; LINDH, M. *et al.* A hepatitis C virus-encoded, nonstructural protein (NS3) triggers dysfunction and apoptosis in lymphocytes: role of NADPH oxidase-derived oxygen radicals. **Journal of Leukocyte Biology**. v. 76, p. 1180-1186, 2004.

THORGEIRSSON, S. S. & GRISHAM, J. W. Molecular pathogenesis of human hepatocellular carcinoma. **Nature Genetics**. v. 31, n. 4, p. 339-46, 2002.

TRABER, M. G.; BURTON, G. W. & HAMILTON, R. L. Vitamin E trafficking. **Annals of the New York Academy of Sciences**. n. 1031, p. 1-12, 2005.

TRABER, M. G. Vitamina E. In: SHILS, M. E. **Tratado de nutrição moderna na saúde e na doença**. ed. 2. São Paulo: Atheneu. p.369-385, 2003.

TRABER, M. G; RAMAKRISHNAN, R.; KAYDEN, H. J. Human plasma vitamin E kinetics demonstrate rapid recycling of plasma RRR-alpha-tocopherol. **Prov. Natl. Acad. Sci. USA**. v. 91, p. 10005-10008, 1994.

TURRENS, J. F.; BOVERIS, A. Generation of superoxide anion by NADH dehydrogenase of bovine heart mitochondria. **The Biochemical Journal**, London. v. 191, n. 2, p. 421-427, 1980.

ULRICH, P. & CERAMI, A. Protein glycation, diabetes and aging. **Recent Progress in Hormone Research**. v. 1, p. 56, 2001.

VALKO, M.; RHODES, C. J.; MONCOL, J. *et al.* Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. **Chemico-biological interactions**. v. 160, p. 1-40, 2006.

VENDEMIALE, G; GRATAGLIANO, I.; PORTINCASA, P. *et al.* Oxidative stress in symptom-free HCV Carriers: relation with ALT flare-up. **European Journal of Clinical Investigation**. v. 31, p. 54-63, 2001.

VON-HERBAY, A.; STAHL, W.; NIEDERAU, C. *et al. et al.* Vitamin E improves the aminotransferases status of patients suffering from viral hepatitis C: a randomized, double-blind, placebo-controlled study. **Free Radical Research**. v. 27, p. 599-605, 1997.

WAKITA, T.; PIETSCHMANN, T. KATO, T. *et al.* Production of infectious hepatitis C virus in tissue culture from a cloned viral genome. **Nature Medicine**. v. 11, p. 791-796, 2005.

WANG, T. & WEINMAN, S. Causes and consequences of mitochondrial reactive oxygen species generation in hepatitis C. **Journal of Gastroenterology and Hepatology**. v. 21, p. 34-37, 2006.

WANG, X. W.; HUSSAIN, S. P.; HUO, T. I. *et al.* Molecular pathogenesis of human hepatocellular. **Toxicology**. v. 181-182, p. 43-47, 2002.

WARIS, G. & SIDDIQUI, A. Hepatitis C virus stimulates the expression of cyclooxygenase-2 via oxidative stress: role of prostaglandin E₂ in RNA replication. **Journal of Virology**. v. 79, n. 15, p. 9725-9734, 2005.

WARIS, G.; AHSAN, H. Reactive oxygen species: role in the development of cancer and various chronic conditions. **Journal of carcinogenesis**. v. 5, n. 14, 2006.

WELCH, K. D.; DAVIS, T. Z.; VAN EDEN, M. E. *et al.* Deleterious iron-mediated oxidation of biomolecules. **Free Radical Biology and Medicine**. v. 32, p. 577-583, 2002.

WILHINSON, J. H. Clinical significance of enzyme activity measurements. **Clinical Chemistry**. v. 16, n. 11, p. 882-890, 1970.

WILHELM FILHO, D.; TORRES, M. A.; MARCON, J. L. *et al.* Comparative antioxidant defenses in vertebrates - Emphasis on fish and mammals. **Trends in Comparative Biochemistry and Physiology** v. 7, p. 33-45, 2000.

WINTERGERST, E. S.; MAGGINI, S. & HORNIG, D. H. Immune-enhancing role of vitamin C and zinc and effect on clinical conditions. **Annals of Nutrition Metabolism**. v. 50, p. 85-94, 2006.

WOOD, R. J. Assessment of marginal zinc status in humans. **Journal of Nutrition**. v. 130, p. 135-1354, 2000.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Obesity: preventing and managing the global epidemic. **Report of a WHO consultation on obesity**. Geneva, 1998.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Hepatitis C: global prevalence. **Wkly Epidemiology Records**. v.75, p. 18-19, 2000.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Hepatitis C: global prevalence. **Wkly Epidemiology Records**. 2007.

WÜNSCHMANN, S.; MEDH, J. D.; KLINZMANN, D. *et al.* Characterization of hepatitis C virus (HCV) and HCV E2 interactions with CD81 and the low-density lipoprotein receptor. **Journal of Virology**. v. 74, p. 10055-10062, 2000.

YADAV, D.; HERTAN, H. I.; SCHWEITZER, P. *et al.* Serum and liver micronutrient antioxidants and serum oxidative stress in patients with chronic hepatitis C. **The American Journal of Gastroenterology**. v. 97, p. 2634-2639, 2002.

YANAGISAWA, N.; SHIMADA, K.; MIYAZAKI, T. *et al.* Enhanced production of nitric oxide, reactive oxygen species, and pro-inflammatory cytokines in very long chain saturated fatty acid-accumulated macrophages. **Lipids in Health and Disease**. v. 48, n. 7, p. 1-10, 2008.

YUYAMA, L. K. O.; YONEKURA, L.; AGUIAR, J. P. L. *et al.* Zinco. In: COZZOLINO, S. M. F. **Biodisponibilidade de nutrientes**. Barueri, São Paulo: Manole. p. 513-538, 2005.

ZEISEL, S. H. Is there a metabolic basis for dietary supplementation? **American Journal of Clinical Nutrition**. Bethesda. v. 72, p. 507S-511S, 2000. Supplement 2.