

INFLUÊNCIA DO POLIMORFISMO DO GENE HFE NA RESPOSTA
SUSTENTADA A INTERFERON + RIBAVIRINA EM PACIENTES
COM INFECÇÃO CRÔNICA PELO GENÓTIPO 2 OU 3 DO VÍRUS
DA HEPATITE C E FERRITINA SÉRICA ELEVADA

Silvia Coelho Borges

Orientador: Prof. Dr. Hugo Cheinquer

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação:
Ciências em Gastroenterologia da Faculdade de Medicina da
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

"We have scorched the snake, not killed it."

Macbeth, ato três, cena dois.

Shakespeare

Para Hugo, meu incansável
e amoroso guerreiro.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Dr. Hugo Cheinquer, companheiro querido e grande incentivador da minha carreira, agradeço pela sua sabedoria, carinho, bom humor e versatilidade em se desdobrar e se superar sempre. O seu otimismo e incondicional apoio são o cerne deste trabalho.

Ao meu cunhado, Dr. Nelson Cheinquer, que com seus sólidos conhecimentos de epidemiologia, estatística e informática, prestou auxílio incansável na preparação deste manuscrito.

Ao Dr. Luciano Krug e Dra. Patrícia Ashton-Prolla, do Laboratório Amplicon, pela realização da pesquisa das mutações do gene HFE e por me auxiliarem a entender um pouco dos mistérios da genética e biologia molecular.

A meus pais, Rose Marie e Armando, por terem sempre me apoiado e incentivado a estudar, despertando em mim a chama da curiosidade e o prazer libertador do conhecimento e da leitura.

Também agradeço muito ao Geraldo T. Linck, que infelizmente não está mais entre nós, mas que tenho certeza adoraria este momento e deve estar me acompanhando de algum lugar.

À minha irmã Luísa, meus sogros Mauricio e Dacia e minha mãe, verdadeiros “dublês de pai e mãe”, sempre dispostos a ajudar e cuidar dos meus filhos, para que os momentos de estudo, idas a Congressos Médicos e afins sejam menos penosos aos pequenos.

Por último, mas não menos importante, meu agradecimento maior aos pacientes, que constituem o objetivo principal do nosso esforço.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – O gene HFE, localizado no braço curto do cromossoma 6, posição 21.3.....	1
Figura 2A e Figura 2B – Interação entre a proteína HFE e o receptor da transferrina (TfR1) nas criptas dos enterócitos, sem mutação HFE (A) e com mutação HFE (B).....	3
Figura 3A e Figura 3B – Detecção das mutações C282Y e H63D por PCR (A) e RFLP (B).....	28
Figura 4 – Prevalência das mutações do gene HFE em 44 pacientes com hepatopatia crônica pelo genótipo 2 ou 3 do vírus C e ferritina acima de 500 ng/dl.....	32
Figura 5 – Distribuição dos 16 pacientes com mutações do gene HFE.....	33
Figura 6 – Acurácia das mutações do gene HFE para a ocorrência de resposta virológica sustentada.....	36
Figura 7 – Acurácia da saturação da transferrina para mutações HFE.....	37

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 – Mutações C282Y e H63D do gene HFE da hemocromatose hereditária.....6
- Tabela 2 – Frequência de homozigotos (C282Y/C282Y) e heterozigotos compostos (C282Y/H63D) em pacientes com quadro clínico clássico de HH em diferentes países.....8
- Tabela 3 – Níveis médios do índice de ferro hepático pré-tratamento em pacientes com hepatite crônica C com e sem resposta virológica sustentada ao interferon isolado ou associado a ribavirina.....13
- Tabela 4 – Níveis médios de ferritina sérica pré-tratamento em pacientes com hepatite crônica C com e sem resposta virológica sustentada ao interferon isolado ou associado à ribavirina.....14
- Tabela 5 – Efeito da flebotomia pré-tratamento na resposta virológica sustentada ao Interferon em pacientes com hepatite crônica C.....15
- Tabela 6 – Características demográficas, laboratoriais, histológicas e de resposta ao tratamento com interferon + ribavirina em pacientes portadores de hepatopatia crônica pelo vírus C com e sem mutação do gene HFE.....34
- Tabela 7 – Características demográficas, laboratoriais, histológicas e genéticas dos pacientes portadores de hepatopatia crônica pelo vírus C com e sem resposta virológica sustentada ao tratamento com interferon+ribavirina....35

LISTA DE ABREVIATURAS

HFE: Gene da hemocromatose hereditária

HLA: Complexo de histocompatibilidade

β 2M: β 2-microglobulina

TfR-1: receptor 1 da transferrina

HH: Hemocromatose hereditária

C282Y: Mutação do gene HFE (troca de cisteína por tirosina na posição 282)

H63D: Mutação do gene HFE (troca de histidina por aspartato na posição 63)

IFN: Interferon

MU: Milhões de unidades

RBV: Ribavirina

VHC: Vírus da hepatite C

VHB: Vírus da hepatite B

PCR: Reação em cadeia da polimerase

RFLP: Polimorfismo do comprimento dos fragmentos de restrição

RNA: Ácido ribonucleico

DNA: Ácido desoxiribonucleico

ALT: Aminotransferase da alanina

AST: Aminotransferase do aspartato

RVFT: Resposta virológica ao final do tratamento

RVS: Resposta virológica sustentada

NR: Não respondedor

ESC: Escape

REC: Recidiva

HCPA: Hospital de Clínicas de Porto Alegre

RS: Rio Grande do Sul

CONEP: Comissão Nacional de Ética em Pesquisa

F = Fibrose hepática

UFRGS = Universidade Federal do Rio Grande do Sul

SES/RS = Secretaria da Saúde do Estado do Rio Grande do Sul

SUMÁRIO

Resumo	IX
Abstract.....	XI
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 O gene HFE.....	1
1.2 Sobrecarga de ferro na hepatite crônica C	10
1.3 O gene HFE na hepatite crônica C	16
2. OBJETIVOS	21
3. PACIENTES E MÉTODOS	22
3.1 Pacientes.....	22
3.2 Métodos	24
4. RESULTADOS	32
5. DISCUSSÃO	38
6. CONCLUSÕES	62
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	63
ANEXO A (LISTA DE PACIENTES).....	81
ARTIGO	83

RESUMO

O objetivo do presente estudo foi verificar a ocorrência de resposta virológica sustentada (RVS) ao tratamento com interferon (IFN) + ribavirina (RBV) em relação à presença ou ausência das mutações H63D e/ou C282Y do gene HFE em grupo de pacientes com hepatite crônica C e ferritina elevada infectados com o genótipo 2 ou 3 do vírus da hepatite C (VHC).

Foram incluídos um total de 44 pacientes virgens de tratamento, com hepatite crônica C e ferritina sérica >500 ng/mL. A média de idade foi de $48,4 \pm 7,7$ anos (variação: 26 a 63 anos). Quarenta pacientes (91%) eram homens e todos eram brancos. Quanto ao genótipo do VHC, 38 (86%) tinham genótipo 3 e 6 (14%) tinham genótipo 2. Todos possuíam ALT elevada e biópsia hepática compatível com hepatite crônica C pré-tratamento, sem qualquer outra hepatopatia. A média da ferritina sérica foi de 1.097 ± 552 ng/ml (variação: 500 a 2.865) e a média da saturação da transferrina foi de $51\% \pm 18\%$ (variação: 25% a 86%). Nenhum paciente apresentou critério histológico para diagnóstico de hemocromatose hereditária. A análise histológica do escore da fibrose hepática revelou o seguinte estadiamento: 28 pacientes (64%) com cirrose (Metavir F4); 5 pacientes (12%) com numerosos septos e fibrose em ponte, sem cirrose (Metavir F3); 1 paciente (2%) com expansão fibrosa dos espaços-porta e raros septos (Metavir F2); 8 pacientes (18%) com expansão fibrosa dos espaços-porta, sem septos (Metavir F1) e 2 pacientes (4%) sem fibrose (Metavir F0).

Todos os pacientes foram tratados com IFN (3 MU, 3 vezes/semana) + RBV (1.000 mg/dia) por pelo menos 24 semanas. Apenas os pacientes que receberam $>80\%$ da dose de IFN e $>80\%$ da dose de RBV por $>80\%$ do tempo previsto de

tratamento foram incluídos. A RVS foi definida por achado de RNA-VHC negativo 24 semanas ou mais pós-tratamento. O RNA-VHC sérico foi medido por PCR qualitativo próprio com limite de detecção de 50 UI/ml. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da instituição e todos assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido.

Foram obtidos os seguintes resultados:

- Mutações do gene HFE foram detectadas em 16 (36%) pacientes, assim distribuídos: heterozigotos H63D: 11 pacientes (68%); heterozigotos C282Y: 2 pacientes (13%), e heterozigotos compostos H63D + C282Y: 3 pacientes (19%). Nenhum paciente foi homozigoto para qualquer das mutações.
- Nenhum dos 16 pacientes pertencentes ao grupo com mutações HFE apresentou RVS, enquanto que 11 (39%) dos 28 pacientes pertencentes ao grupo sem mutações HFE apresentaram RVS ($P = 0,003$; Teste Exato de Fisher). A única variável associada com RVS na população estudada foi a presença ou não da mutação do gene HFE.

Com base nos resultados obtidos, conclui-se que a presença de mutações H63D e/ou C282Y do gene HFE foi fator preditivo de ausência de RVS ao IFN + RBV em pacientes com hepatopatia crônica pelo genótipo 2 ou 3 do VHC e níveis séricos elevados de ferritina.

ABSTRACT

The aim of this study was to assess the occurrence of sustained viral response (SVR) to interferon (IFN) + ribavirin (RBV) with regard to the presence or absence of H63D and/or C282Y HFE gene mutations, in a group of patients with chronic hepatitis C and elevated serum ferritin infected with hepatitis C virus (HCV) genotype 2 or 3.

A total of 44 treatment naïve patients with chronic hepatitis C and serum ferritin >500 ng/mL were included. Median age was 48.4 ± 7.7 years (range: 26-63 years). Forty patients (91%) were males and all were caucasians. HCV genotype 3 was found in 38 (86%) cases and genotype 2 was found in 6 (14%) cases. All patients had elevated ALT and liver biopsy compatible with chronic hepatitis C before treatment, without any other form of liver disease. Median serum ferritin was 1.097 ± 552 ng/ml (range: 500-2,865) and median transferrin saturation was $51\% \pm 18\%$ (range: 25%-86%). No patient had histologic diagnosis of hereditary hemochromatosis. Histological analysis of the liver fibrosis score revealed the following staging: 28 patients (64%) with cirrhosis (Metavir F4); 5 patients (12%) with numerous septa and bridging fibrosis, without cirrhosis (Metavir F3); 1 patient (2%) with portal fibrosis and rare septa (Metavir F2); 8 patients (18%) with portal fibrosis without septa (Metavir F1) and 2 patients (4%) without fibrosis (Metavir F0).

All patients were treated with IFN (3 MU, three times a week) + RBV (1,000 mg, daily) for at least 24 weeks. Only patients who received >80% of IFN, >80% of RBV dose for >80% of the intended treatment duration were included. SVR was

defined as negative HCV-RNA 24 weeks after the end of treatment. Serum HCV-RNA was measured by qualitative in house PCR with a limit of detection of 50 IU/ml. The study was approved by the institution ethics committee and all patients signed the informed consent form.

The following results were obtained:

- HFE gene mutation was detected in 16 (36%) patients, with the following distribution: heterozygous H63D: 11 patients (68%); heterozygous C282Y: 2 patients (13%), and compound heterozygous H63D + C282Y: 3 patients (19%). No patient was found with homozygosis for either mutation.
- None of the 16 patients with HFE gene mutations achieved a SVR, while 11 (39%) of the 28 patients without HFE gene mutations showed a SVR ($P=0.003$; exact Fisher test). The only variable associated with SVR in this population was the HFE gene mutation status.

Based on the results obtained, it can be concluded that the presence of H63D and/or C282Y HFE gene mutations constitute predictive factors for the absence of SVR to IFN + RBV among patients with genotype 2 or 3 HCV related chronic liver disease and elevated ferritin levels.

1. INTRODUÇÃO

1.1 O gene HFE

Em 1996, Feder et al (FEDER et al, 1996) descobriram o gene HFE, localizado no braço curto do cromossoma 6, na posição 21.3 (Figura 1). Sabe-se, atualmente, que esse gene codifica a síntese de glicoproteína com 343 aminoácidos, homóloga ao complexo de histocompatibilidade (HLA) classe I (EISENBACH et al, 2004). Essa proteína liga-se com a β 2-microglobulina (β 2M) e interage com o receptor da transferrina (TfR-1) nos enterócitos das criptas duodenais, regulando assim a absorção do ferro da dieta (BENNETT et al, 2000; BONFORD, 2002; BRITTON et al, 2002; TRINDER et al, 2002).

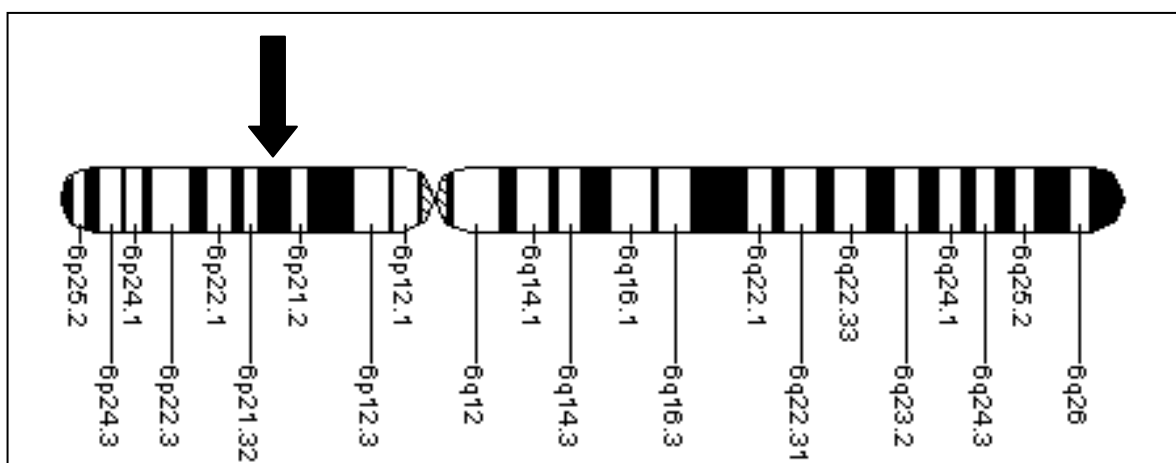


Figura 1. O gene HFE (seta), localizado no braço curto do cromossoma 6, posição 21.3.

Mutações no gene HFE podem provocar distúrbios no metabolismo do ferro no organismo, constituindo a principal causa de hemocromatose hereditária (HH) no mundo (FLEMING et al, 2004). Cerca de 80% a 90% dos pacientes brancos de origem europeia com diagnóstico clínico de HH são homocigotos para mutação no nucleotídeo 845 do gene HFE, resultando na troca de cisteína por tirosina no aminoácido localizado na posição 282 (C282Y) da proteína HFE (FEDER et al, 1996; POWELL et al, 2000; BONFORD, 2002; PIETRANGELO, 2003; EISENBACH et al, 2004). Essa mutação impede a ligação entre a proteína HFE e a β 2M, reduzindo a expressão do complexo HFE/TfR-1 na superfície dos enterócitos duodenais (FEDER et al, 1997) (figura 2A e 2B).

Outra mutação bem conhecida do gene HFE é aquela que ocorre no nucleotídeo 187, codificando para substituição de histidina por aspartato no aminoácido da posição 63 (H63D) da proteína HFE (FEDER et al, 1996). Sabe-se que indivíduos com essa mutação, tanto homocigotos quanto heterocigotos, podem apresentar certo grau de elevação dos marcadores bioquímicos de ferro (ferritina sérica e saturação da transferrina), porém a forma fenotípica da HH não costuma ocorrer (FLEMING et al, 2004).

Por outro lado, existem casos bem demonstrados de HH clínica em indivíduos heterocigotos compostos, nos quais um alelo possui a mutação C282Y enquanto que o outro alelo possui a mutação H63D (FEDER et al, 1996). Curiosamente, a troca desses aminoácidos não parece afetar a ligação da proteína HFE com a β 2M ou sua expressão na superfície da célula, permanecendo desconhecido o seu papel no distúrbio do metabolismo do ferro (PIETRANGELO, 2003).

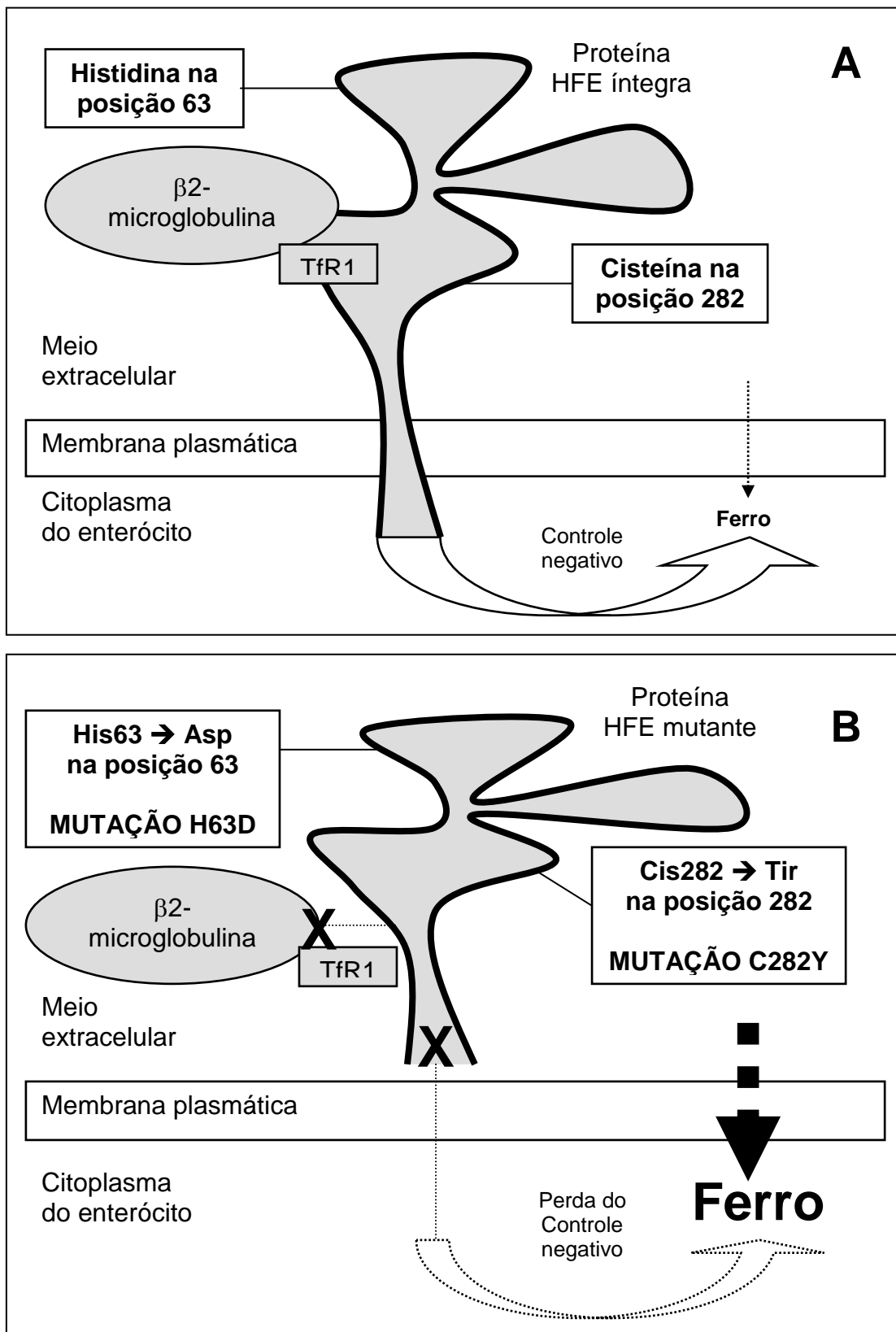


Figura 2. Interação entre a proteína HFE e o receptor da transferrina (TfR1) nas criptas dos enterócitos, sem mutação HFE (A) e com mutação HFE (B).

Sabe-se que adultos saudáveis acumulam 3-5 g de ferro corporal, sendo a maior parte armazenada na hemoglobina dos eritrócitos, no fígado e nos macrófagos do sistema reticuloendotelial (TOWNSEND & DRAKESMITH, 2002). Cerca de 20-30mg de ferro são necessários diariamente para a eritropoiese, sendo 1-2 mg perdidos por descamação da pele ou menstruação. O ferro perdido deve ser repostado a partir da absorção do ferro da dieta, a qual ocorre fundamentalmente através dos enterócitos maduros encontrados no ápice das vilosidades duodenais (ANDREWS et al, 1999).

O mecanismo exato por meio dos quais as mutações do gene HFE provocam a sobrecarga de ferro característica da HH ainda não está totalmente elucidado. Existem, atualmente, duas hipóteses principais: a da hepcidina e a da programação das células das criptas duodenais (FLEMING et al, 2004). Essas hipóteses não são mutuamente excludentes, diferindo apenas quanto ao tipo de célula afetada pela perda do funcionamento da proteína HFE: o hepatócito na hipótese da hepcidina e o enterócito na hipótese da programação das células das criptas duodenais.

Segundo a hipótese da hepcidina, os hepatócitos seriam os principais reguladores do metabolismo do ferro no organismo, secretando para o plasma esse peptídeo inibidor da absorção do ferro da dieta (PARK et al, 2001; GANZ, 2003; FLEMING et al, 2004; IOANNOU & KOWDLEY, 2004). Nos pacientes com HH e mutações do gene HFE, a proteína HFE mutante faria com que os hepatócitos não recebessem a informação da verdadeira quantidade de ferro circulante, levando a diminuição na produção de hepcidina. Com a perda desse peptídeo, os enterócitos duodenais passariam a absorver ferro sem controle,

levando a sobrecarga típica da HH (BRIDLE et al, 2003; GANZ, 2003; FLEMING et al, 2004; IOANNOU & KOWDLEY, 2004).

Por outro lado, segundo a hipótese da programação das células das criptas duodenais, pacientes com proteína HFE mutante teriam alteração da expressão do complexo HFE/TfR-1 na membrana dos enterócitos das criptas duodenais (FLEMING et al, 2004). Esses enterócitos, pela perda do mecanismo sensor de ferro, transformar-se-iam em células maduras programadas para absorver ferro em excesso no ápice das vilosidades (TAYLOR et al, 1966; LOMBARD et al, 1997; WAHEED et al, 1997; PHILPOTT 2002; TOWNSEND & DRAKESMITH, 2002; BOMFORD, 2002; FLEMING et al, 2004).

Atualmente, um dos métodos mais usados para o diagnóstico das mutações do gene HFE consiste na amplificação do ácido desoxiribonucleico (DNA) por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR), com iniciadores específicos para o local das mutações (FEDER et al, 1996).

A identificação dos alelos das mutações, por sua vez, baseia-se na técnica do polimorfismo do comprimento dos fragmentos de restrição (RFLP), para verificar se o paciente é homocigoto ou heterocigoto (FLEMING et al, 2004). Como os genes são compostos por dois alelos, as duas principais mutações do gene HFE (C282Y e H63D) podem ser encontradas em diferentes combinações (tabela 1).

Tabela 1. Mutações C282Y e H63D do gene HFE da hemocromatose hereditária

ALELO 1 / ALELO 2	INTERPRETAÇÃO
C282Y: Negativo/Negativo H63D: Negativo/Negativo	Ausência das mutações comuns da HH nos dois alelos.
C282Y: Negativo/Positivo H63D: Negativo/Negativo	Heterozigoto C282Y (apenas um alelo afetado do gene HFE)
C282Y: Negativo/Negativo H63D: Negativo/Positivo	Heterozigoto H63D (apenas um alelo afetado do gene HFE)
C282Y: Positivo/Positivo H63D: Negativo/Negativo	Homozigoto C282Y (ambos alelos afetados do gene HFE)
C282Y: Negativo/Negativo H63D: Positivo/Positivo	Homozigoto H63D (ambos alelos afetados do gene HFE)
C282Y: Positivo/Negativo H63D: Positivo /Negativo	Heterozigoto composto (um alelo afetado de cada gene HFE simultaneamente)

As mutações C282Y e H63D acometem particularmente as populações de origem celta, sendo a prevalência de homozigotos estimada em 1:200 habitantes no Norte da Europa (PHILPOTT, 2002; BOMFORD, 2002; TAVILL, 2001). A mutação C282Y parece ter surgido há cerca de 2.000 anos na espécie humana e encontra-se virtualmente ausente em populações não caucasianas, tais como africanos, asiáticos e aborígenes australianos (CULLEN et al, 1998). A mutação H63D, por outro lado, é mais antiga que a C282Y, sendo encontrada em frequência superior a 5% nas populações da Europa, Bacia do Mediterrâneo, Oriente Médio, Ásia e Índia (MERRYWEATHER-CLARKE et al, 1997).

A prevalência média da mutação C282Y em populações Européias está estimada em 0,4% de homozigotos e 9,2% de heterozigotos (HANSON et al,

2001). Resultados semelhantes foram descritos para populações caucasianas da América do Norte, Nova Zelândia e Austrália, refletindo provavelmente o fluxo de imigrantes Europeus para essas regiões nos últimos 400 anos (BURT et al, 1998; STEINBERG et al, 2001).

Na Europa existe grande variação na frequência de heterozigotos para a mutação C282Y, diminuindo drasticamente no sentido Norte-Sul e Oeste-Leste (LUCOTTE, 2001). A Irlanda possui a maior frequência (14,2%), seguida pela França (9,4%) e País de Gales (8,3%) (RYAN et al, 1998; JEZEQUEL et al, 1998; JACKSON et al, 2001). Na população do Reino Unido a frequência variou entre 6% e 11% (SMITH et al, 1998). A menor frequência européia (1,6%) foi descrita na Itália (CASSANELLI et al, 2001).

No Brasil, estudo em amostra randômica obtida entre indivíduos normais no Rio de Janeiro evidenciou 3% de heterozigotos C282Y e 12% de heterozigotos H63D (KLAINCHOT, 2001), sendo inferior aos resultados encontrados na população européia, com exceção da Itália.

Dependendo da região geográfica estudada, verifica-se que aproximadamente 60% a 100% dos pacientes caucasianos com diagnóstico clínico de HH são homozigotos C282Y, sendo outros 3-5% heterozigotos compostos (C282Y/H63D) ou homozigotos H63D (MERRYWEATHER-CLARKE et al, 1997; RAMRAKHIANI e BACON, 2001). Na França, Reino Unido e Austrália, mais de 90% dos pacientes com HH são homozigotos C282Y (SMITH et al, 1998).

Por outro lado, no Sul da Itália, apenas 33% dos pacientes com fenótipo de HH apresentaram mutações C282Y e/ou H63D do gene HFE (FLEMING et al, 2004). Além disso, a frequência da mutação C282Y tem sido praticamente nula em pacientes não caucasianos com HH provenientes da Ásia, África e Índia

(BOMFORD, 2002). No Brasil, estudos preliminares com pequeno número de pacientes com fenótipo de HH também indicam baixa taxa de homozigotos C282Y, variando entre 40-53% dos casos em dois trabalhos publicados (BITTENCOURT, 2001; CARVALHO-FILHO, 2001). A frequência de homozigotos C282Y e heterozigotos compostos (C282Y/H63D) em pacientes com quadro clínico clássico de HH, provenientes de diversos países, encontra-se resumida na tabela 2.

Tabela 2. Frequência de homozigotos (C282Y/C282Y) e heterozigotos compostos (C282Y/H63D) em pacientes com quadro clínico clássico de HH em diferentes países.

PAÍS	C282Y/C282Y	C282Y/H63D	REFERÊNCIA
Austrália	100%	0%	Jazwinska et al, 1996
Norte da França	96%	3%	Jouanolle et al, 1996
Reino Unido	91%	3%	The UK H.C.* 1997
Irlanda	90%	4%	Ryan et al, 1998
Alemanha	90%	4%	Nielsen et al, 1998
Estados Unidos	83%	5%	Feder et al, 1996
Áustria	77%	8%	Datz et al, 1997
Sul da França	72%	4%	Borot et al, 1997
Itália	64%	5%	Piperno(a) et al, 1998

* H.C. = hemochromatosis consortium; C282Y/C282Y = homozigoto para a mutação C282Y do gene HFE; C282Y/H63D = heterozigoto composto.

A ocorrência de HH em indivíduos sem qualquer mutação identificável no gene HFE poderia ser decorrente de graus variáveis de heterogeneidade genética, sugerindo a existência de casos de HH originados por mutações em genes ainda desconhecidos (CONTE et al, 1998; BOMFORD, 2002).

Deve ser ressaltado que o teste genético não é soberano no diagnóstico da HH, devido ao fato da penetrância clínica ser extremamente variável (PARKKILA

et al, 2001). Assim, existem indivíduos com mutações típicas da HH (homozigotos C282Y ou heterozigotos compostos C282Y/H63D) que nunca chegam a desenvolver a forma fenotípica clássica da doença (BURT et al, 1998; McDONNELL et al, 1999; ADAMS, 2000; WILLIS et al, 2000; ASBERG et al, 2001; BOMFORD, 2002; PHILPOTT, 2002).

Nesse sentido, estudo populacional realizado na Austrália em 1999 (OLYNYK et al, 1999), envolvendo 3.011 adultos brancos, mostrou elevação da saturação da transferrina e da ferritina em 94% dos homozigotos C282Y identificados, porém apenas 58% desses indivíduos apresentavam alteração histológica hepática compatível com diagnóstico de HH.

Do mesmo modo, estudos populacionais realizados no País de Gales (JACKSON et al, 2001) e Canadá (ADAMS et al, 2000), mostraram que apenas 20% dos indivíduos homozigotos C282Y identificados apresentavam evidência bioquímica de sobrecarga de ferro, todos de baixa intensidade, sem qualquer indício de dano tecidual em órgãos-alvo.

Com efeito, estudo recente (BEUTLER et al, 2002), envolvendo 41.000 indivíduos submetidos a exames laboratoriais de rotina na Califórnia, EUA, encontrou 152 (0,4%) homozigotos C282Y, dos quais apenas um apresentava quadro clínico compatível com o diagnóstico de HH, sugerindo penetrância inferior a 1% em homens e ainda menor em mulheres.

Quanto aos homozigotos H63D, estudo realizado no Sul da França envolvendo 50 indivíduos com esse genótipo, mostrou 25% de sobrecarga de ferro e apenas três casos de cirrose por HH (AGUILAR-MARTINEZ et al, 2001). A penetrância dos heterozigotos compostos (C282Y/H63D) parece ser igualmente baixa (BRISSOT et al, 1999). Estima-se que até 10% dos indivíduos heterozigotos

C282Y possam apresentar evidência bioquímica de sobrecarga de ferro, porém raramente encontra-se doença histológica hepática significativa (BOMFORD, 2002).

A falta de conhecimento em relação à verdadeira penetrância da mutação C282Y do gene HFE da HH dificulta a implementação de testes de triagem genética direcionados para a população geral. Aparentemente, um número extremamente elevado de indivíduos homozigotos C282Y teria que ser identificado e acompanhado por longo prazo para prevenir a ocorrência de um único caso da forma fenotípica da doença (BOMFORD, 2002).

Portanto, recomenda-se atualmente que a triagem para HH com testes genéticos (mutações C282Y e H63D) restrinja-se a populações de risco, incluindo indivíduos com indício de sobrecarga de ferro (elevação da saturação da transferrina e/ou ferritina), diagnóstico de hepatopatia crônica e/ou outras doenças potencialmente associadas com sobrecarga de ferro, tais como diabetes *mellitus*, insuficiência cardíaca, impotência, artrite, porfiria cutânea tarda ou familiares de pacientes com HH (TAVILL, 2001; KRAWCZAK et al, 2001; FLEMING et al, 2004).

1.2 Sobrecarga de Ferro na Hepatite Crônica C

O vírus da hepatite C (VHC), clonado em 1989, pertence à família *Flaviviridae*, sendo composto por RNA de hélice simples com polaridade positiva e envelope lipídico (CHOO et al, 1989). O VHC é o principal agente etiológico da

hepatite não-A, não-B pós-transfusional (DONAHUE et al, 1992). Esse agente viral apresenta grande diversidade genética, representada pela existência de pelo menos seis genótipos e mais de 50 subtipos, razão pela qual cronifica em 60% a 85% dos casos (MARTELL et al, 1992; DOMINGO et al, 1996). Acredita-se que existam cerca de 170 a 300 milhões de indivíduos cronicamente infectados no mundo, com prevalência na população variando desde menos de 1% nos países desenvolvidos até mais de 20% em certos locais da África e Oriente Médio (HEINTGES et al, 1997).

Doenças hepáticas crônicas de qualquer etiologia costumam cursar com graus variáveis de deposição de ferro no fígado, porém, na hepatite crônica C este evento ocorre com maior frequência do que qualquer outra hepatopatia, com exceção da HH (SMITH et al, 1998).

De fato, sabe-se que cerca de 20% a 30% dos pacientes com hepatite crônica C apresentam marcadores séricos de sobrecarga de ferro, tais como elevação da ferritina e da saturação de transferrina (BONKOVSKY et al, 1997).

Interessante notar que a análise histológica hepática mostra que o depósito de ferro na hepatite C encontra-se geralmente nas células de Kupffer, enquanto que na HH concentra-se no interior dos hepatócitos (BACON, 1998; EISENBACH et al, 2004). Além disso, a análise da quantificação de ferro no tecido hepático em pacientes com hepatite C e marcadores séricos de sobrecarga de ferro costuma ser significativamente menor do que a encontrada em indivíduos com diagnóstico de HH (EISENBACH et al, 2004).

Com efeito, Di Bisceglie et al (Di BISCEGLIE et al, 1992) relataram evidência bioquímica de sobrecarga de ferro, definida como elevação dos níveis séricos de ferro, ferritina e/ou saturação da transferrina, em 46% de 80 pacientes

com hepatite crônica viral, porém apenas 5% apresentaram concentração de ferro no fígado acima de 25 μmol por grama de peso seco, considerado como o limite superior da normalidade.

Embora a história natural da infecção pelo VHC ainda não tenha sido completamente elucidada, sabe-se que a doença não apresenta evolução uniforme em todos indivíduos infectados (ROUDOT-THORAVAL et al, 1997). Enquanto alguns indivíduos progridem para cirrose e carcinoma hepatocelular em 20-30 anos, outros permanecem com hepatite leve e mínima fibrose por mais de 50 anos (ALBERTI et al, 1999).

Ainda não se sabe porque alguns pacientes infectados apresentam doença progressiva enquanto outros desenvolvem curso indolente, porém o papel patogênico do ferro na hepatite crônica C tem sido sugerido por diversos autores, associando o excesso de ferro hepático com maior fibrogênese hepática, maior risco de evolução para cirrose, maior chance de carcinoma hepatocelular e menor resposta ao tratamento antiviral (Di BISCEGLIE et al, 1992; BEINKER et al, 1996; BACON, 1998; BONKOVSKY et al, 1997; SMITH et al, 1998; HEZODE et al, 1999; GIANNINI et al, 2001; EISENBACH et al, 2004).

É digno de nota que alguns estudos não encontraram associação entre ferro e maior progressão da fibrose em pacientes com hepatite crônica C (HAQUE et al, 1996; LEBRAY et al, 2004), sugerindo que essa relação possa ser controversa.

Têm sido postulado que o excesso de ferro poderia provocar lesão hepática por indução de estresse oxidativo e liberação de citocinas implicadas na fibrogênese hepática, destacando-se aumento na expressão do fator transformador de crescimento beta (HOUGLUM et al, 1997) e ativação da célula

de Ito (RAMM et al, 1997; MARTINELLI et al, 2004). Além disso, o excesso de ferro parece diminuir a imunidade celular em pacientes com hepatite crônica C, podendo potencializar o dano hepático, aumentar a replicação viral e diminuir a resposta ao tratamento antiviral (WEISS et al, 1999; KAKIZAKI et al, 2000).

Deve-se ressaltar que a influência negativa da sobrecarga de ferro tecidual na RVS ao tratamento dos pacientes com hepatite crônica C foi evidente apenas nos estudos que utilizaram o IFN em monoterapia (VAN THIEL et al, 1994; CLEMENTE et al, 1994; OLYNYK et al, 1995; IZUMI et al, 1996; KAGEYAMA et al, 1998; PIANKO et al, 2002), porém não nos que empregaram IFN combinado com ribavirina (RBV) (PIANKO et al, 2002; HOFER et al, 2004; LEBRAY et al, 2004). (Tabela 3).

Tabela 3. Níveis médios do índice de ferro hepático pré-tratamento em pacientes com hepatite crônica C com e sem resposta virológica sustentada ao interferon isolado ou associado a ribavirina.

REFERÊNCIA	N	IFH COM RVS	IFH SEM RVS	P
Van Thiel et al, 1994 [†]	79	638	1.156	<0,05
Clemente et al, 1994 [†]	51	118	218	<0,01
Olynyk et al, 1995 [†]	58	548	860	<0,05
Barton et al, 1995 [†]	14	624	782	NS
Izumi et al, 1996 [†]	65	429	875	<0,05
Kageyama et al, 1998 [†]	28	343	710	<0,05
Pianko et al, 2002 [†]	51	241	803	<0,01
Pianko et al, 2002 ^{††}	40	662	533	NS
Hofer et al, 2004 ^{††}	135	458	445	NS

IFH = índice médio de ferro hepático (mcg/g) pré-tratamento; RVS = RNA-VHC negativo seis meses pós-tratamento; NS = diferença não significativa ($P>0,05$); [†] = tratamento com interferon isolado; ^{††} = tratamento com interferon + ribavirina.

Por outro lado, a maioria dos estudos, incluindo os mais recentes (DISTANTE et al, 2002; HOFER et al, 2004; LEBRAY et al, 2004), têm destacado o fato de que os não respondedores apresentaram níveis séricos de ferritina mais elevados pré-tratamento em comparação com os pacientes que alcançaram a RVS (tabela 4). Assim, parece provável que o achado de níveis séricos basais elevados de ferritina constitua importante fator preditivo de má resposta ao tratamento, porém por mecanismos aparentemente não relacionados com a deposição de ferro no tecido hepático.

Tabela 4. Níveis médios de ferritina sérica pré-tratamento em pacientes com hepatite crônica C com e sem resposta virológica sustentada ao interferon isolado ou associado a ribavirina.

REFERÊNCIA	N	FER COM RVS	FER SEM RVS	P
Van Thiel et al, 1994 [†]	79	329	376	NS
Clemente et al, 1994 [†]	51	1.812	2.463	0,002
Barton et al, 1995 [†]	14	150	387	NS
Girelli et al, 1995 [†]	74	168	439	0,003
Distante et al, 2002 ^{††}	256	75	130	0,03
Hofer et al, 2004 ^{††}	131	137	270	<0,01

FER = média da ferritina sérica (ng/ml) pré-tratamento; RVS = RNA-VHC negativo seis meses pós-tratamento; NS = diferença não significativa ($P>0,05$); [†] = tratamento com interferon isolado; ^{††} = tratamento com interferon + ribavirina.

Apesar dos estudos não comprovarem que a maior concentração de ferro hepático seja fator preditivo negativo de RVS em pacientes com hepatite crônica C, alguns autores (HAYASHI et al, 1994; SARTORI et al, 2001) relataram melhora bioquímica e histológica com o emprego de sangrias em pacientes com hepatite crônica C e sobrecarga de ferro. Essa observação inicial levou a suposição de

que a redução do ferro hepático, por meio de sessões de flebotomia pré-tratamento, poderia aumentar a chance de RVS ao IFN (VAN THIEL et al, 1996).

Apesar da análise dos resultados apontar para maior tendência a RVS no grupo de pacientes flebotomizados (tabela 5), deve-se salientar que a magnitude da diferença observada na maioria dos estudos foi pequena. Além disso, os trabalhos publicados até o momento restringiram sua análise a pacientes tratados com IFN convencional em monoterapia, deixando de avaliar os efeitos da flebotomia em pacientes tratados com a combinação IFN (convencional ou peguilado) + RBV. Portanto, mesmo existindo evidências de que existiria menor percentual de RVS em pacientes com hepatite crônica C e ferritina elevada, permanece ainda controverso o uso da flebotomia como coadjuvante ao tratamento antiviral, principalmente pelo risco de potencializar a anemia associada ao uso da RBV.

Tabela 5 – Efeito da flebotomia pré-tratamento na resposta virológica sustentada ao Interferon em pacientes com hepatite crônica C.

REFERÊNCIA	N	TIPO	RVS C/ FLEBO	RVS S/ FLEBO	P
Van Thiel et al, 1996 [†]	30	NR	60%	13%	0,04
Tsai et al, 1997	20	NR	15%	-	-
Guyader et al, 1999	11	NR	0%	-	-
Herrera, 1999	33	NR	0%	-	-
Di Bisceglie et al, 2000	96	NR	0%	0%	NS
Fong et al, 1998	38	VT	29%	5%	NS
Fontana et al, 2000	82	VT	17%	7%	NS
Fargion et al, 2002	114	VT	28%	16%	NS

NR = não respondedores; VT = virgens de tratamento; [†] = interferon 5 MU/dia por 24 semanas; RVS = RNA-VHC negativo 6 meses pós-tratamento; FLEBO = flebotomias semanais até hemoglobina entre 10 e 11 g/dl pré-tratamento; NS = diferença não significativa ($P>0,05$).

1.3 O Gene HFE na Hepatite Crônica C

Recentemente alguns autores têm pesquisado a prevalência das mutações C282Y e H63D do gene HFE em pacientes com hepatite C, sem encontrar diferença significativa em comparação com a população geral (EISENBACH et al, 2004). Neste sentido, Piperno et al (PIPERNO(b) et al, 1998) estudaram 110 pacientes com hepatite crônica B e C, comparados com 139 controles, sem notar diferença significativa entre os grupos quanto a frequência das mutações.

Em estudo semelhante, Smith et al (SMITH et al, 1998) analisaram 137 pacientes com hepatite crônica C, encontrando 7% de heterozigotos C282Y. Este valor não foi considerado estatisticamente diferente do grupo controle, composto por 117 indivíduos VHC negativos, onde os autores verificaram 14% de mutações do gene HFE.

No Brasil, existem poucos estudos sobre a prevalência das mutações comuns do gene HFE em pacientes com hepatite crônica C. Em Ribeirão Preto, Martinelli et al (MARTINELLI et al, 2000) investigaram a prevalência de mutações do gene HFE em 135 pacientes com hepatite crônica C, não selecionados por critérios de sobrecarga de ferro. Foram encontrados 6 (4%) heterozigotos C282Y e 32 (24%) heterozigotos H63D, sendo a prevalência semelhante a dos pacientes do grupo controle, sem hepatite C.

No Rio de Janeiro, (TERRA, 2001) foram analisados 228 pacientes com hepatite crônica C, também não selecionados por evidência de sobrecarga de ferro, sendo detectados 10 (4%) heterozigotos C282Y, 55 (24%) heterozigotos

H63D e 5 (2%) homozigotos H63D. Também não foi notada qualquer diferença na prevalência das mutações em relação aos 82 controles VHC negativos.

Em outro estudo, realizado em Recife (CAMPOS et al, 2001), foram avaliados 26 pacientes com hepatite crônica C. Diferentemente dos estudos relatados anteriormente, os autores selecionaram apenas pacientes com saturação da transferrina acima de 55%. Curiosamente, a prevalência das mutações do gene HFE não foi maior do que a relatada nos estudos que avaliaram pacientes não selecionados, sendo encontrados 23% de heterozigotos H63D e 4% de heterozigotos C282Y.

Quanto ao significado clínico do achado das mutações do gene HFE na hepatite crônica C, Piperno et al (PIPERNO(b) et al, 1998), estudando 110 pacientes com hepatite crônica B e C, verificaram que os heterozigotos C282Y e H63D possuíam maior quantidade de ferro hepático e maior percentual de cirrose, sugerindo envolvimento do ferro nos mecanismos de progressão da doença.

Da mesma maneira, Smith et al (SMITH et al, 1998) analisando 137 pacientes com hepatite crônica C, compararam os 10 heterozigotos C282Y com os 127 indivíduos não-mutantes, verificando, respectivamente, maior elevação de ferritina sérica (339 *versus* 153 mcg/ml; $P=0,005$), maior quantidade de ferro hepático (30% *versus* 4%; $P=0,02$) e maior frequência de cirrose (40% *versus* 8,7%; $P=0,01$) nos pacientes com a mutação do gene HFE. Os autores concluíram que a mutação C282Y do gene HFE parecia de fato influir na história natural da hepatite C, potencializando a progressão para cirrose.

Em estudo semelhante, conduzido no Brasil, Martinelli et al (MARTINELLI et al, 2000) investigaram a associação entre mutações do gene HFE e gravidade da histologia hepática em 135 pacientes com hepatite crônica C. Comparando os

38 pacientes heterozigotos C282Y ou H63D com os que não possuíam mutações do gene HFE, os autores encontraram níveis mais elevados de ferro sérico e saturação da transferrina, porém não de ferritina sérica. Interessante notar que os escores de fibrose e atividade necroinflamatória hepática foram significativamente maiores nos carreadores das mutações. Os autores também concluíram que a mutação C282Y ou H63D do gene HFE tem impacto na evolução da doença.

Por outro lado, Hezode et al (HEZODE et al, 1999), estudando a associação entre mutações do gene HFE e estágio da fibrose hepática em 209 pacientes com hepatite crônica C, encontraram resultados conflitantes: os 23 (11%) heterozigotos C282Y e os 50 (24%) heterozigotos H63D, comparados aos não-mutantes, não apresentaram maior quantidade de ferro hepático ou maior frequência de cirrose na biópsia hepática. Ao contrário dos estudos anteriores, os autores concluíram que as mutações do gene HFE não parecem conferir efeito negativo aos pacientes com hepatite crônica C. Do mesmo modo, Negro et al (NEGRO et al, 2000) também não encontraram relação entre depósito de ferro hepático e mutações do gene HFE em série de 120 pacientes suíços com hepatite crônica C.

Esses resultados foram corroborados, mais recentemente, por Lebray et al (LEBRAY et al, 2004) em 273 pacientes com hepatite crônica C. Apesar desses autores encontrarem maior elevação dos marcadores bioquímicos de sobrecarga de ferro (ferritina e saturação da transferrina) nos indivíduos heterozigotos C282Y ou H63D, não houve associação entre a presença de mutações do gene HFE e maior quantidade de fibrose ou atividade necro-inflamatória na biópsia hepática.

Quanto à influência do polimorfismo do gene HFE na resposta ao tratamento antiviral em pacientes com hepatite crônica C, além dos estudos relatados por nosso próprio grupo (COELHO BORGES et al, 2001; COELHO BORGES et al, 2002; CHEINQUER et al, 2002), existem apenas três outros estudos publicados (DISTANTE et al, 2002; HOFER et al, 2004; LEBRAY et al, 2004), porém em pacientes com hepatite crônica C que não foram selecionados por critério de sobrecarga de ferro.

No primeiro estudo, Distante et al (DISTANTE et al, 2002) estudaram 256 pacientes com hepatite crônica C, todos virgens de tratamento, sendo dois (0,8%) homozigotos C282Y e 36 (14%) heterozigotos C282Y. A mutação H63D não foi avaliada nesse estudo. Após tratamento com IFN + RBV por seis meses, os autores mostraram RVS em 26/38 (68%) carreadores da mutação C282Y versus 102/216 (48%) não-carreadores ($P = 0,02$).

No segundo estudo, Hofer et al (HOFER et al, 2004) avaliaram 169 pacientes com hepatite crônica C, também virgens de tratamento, sendo 140 tratados com IFN + RBV e 29 com IFN peguilado + RBV. Pacientes com níveis altos de ferritina pré-tratamento apresentaram menor chance de RVS, porém não houve diferença na resposta ao tratamento entre os mutantes do gene HFE e os não mutantes.

Finalmente, no terceiro estudo, Lebray et al (LEBRAY et al, 2004) avaliaram a resposta ao tratamento com IFN + RBV em 146 pacientes com hepatite crônica C sem história de tratamento prévio. Pacientes com mutação C282Y ou H63D apresentaram níveis significativamente mais elevados dos marcadores bioquímicos de sobrecarga de ferro, porém apenas os mutantes H63D possuíam maior quantidade de ferro no tecido hepático. Globalmente a RVS

foi maior nos pacientes com mutação H63D, porém não no subgrupo com ferritina sérica elevada pré-tratamento.

Verifica-se que, até o momento, existem escassos registros na literatura médica de estudos clínicos relacionando a resposta ao tratamento antiviral com a presença das mutações C282Y e H63D do gene HFE em pacientes cronicamente infectados pelo VHC, principalmente no que tange aos pacientes com marcadores séricos de sobrecarga de ferro. Assim, o presente estudo poderia revelar se existe relação entre a magnitude de RVS e o polimorfismo do gene HFE, especialmente numa população de pacientes com genótipo 2 ou 3 do VHC com marcador bioquímico de sobrecarga de ferro, representado pela ferritina sérica.

2. OBJETIVOS

Tendo em vista a inexistência, em nosso meio, de estudos que avaliam a associação entre resposta virológica ao tratamento com IFN + RBV e a presença da mutação C282Y e/ou H63D do gene HFE em pacientes com hepatite crônica C, este estudo propõe-se a:

- Avaliar a prevalência do polimorfismo do gene HFE (mutação C282Y e/ou H63D) em pacientes com infecção crônica causada pelos genótipos 2 ou 3 do VHC e ferritina sérica elevada.
- Avaliar se existem diferenças demográficas (sexo, idade), laboratoriais (saturação da transferrina, ferritina e alanina aminotransferase [ALT]) e/ou histológicas (estágio da fibrose hepática) entre os pacientes com e sem a mutação C282Y e/ou H63D.
- Avaliar se o polimorfismo do gene HFE (mutação C282Y e/ou H63D) influencia a resposta virológica ao tratamento com IFN + RBV em pacientes com infecção crônica causada pelos genótipos 2 ou 3 do VHC e ferritina sérica elevada, de forma independente das variáveis demográficas (sexo, idade), laboratoriais (saturação da transferrina, ferritina, ALT) e/ou histológicas (estágio da fibrose hepática).

3. PACIENTES E MÉTODOS

Este trabalho foi realizado no Ambulatório de Hepatites Virais do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), RS, no período de março de 2000 a dezembro de 2003. Todos pacientes foram incluídos mediante assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido. O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética do HCPA e pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP).

O delineamento do estudo pode ser definido como transversal, pois foram avaliados simultaneamente o fator em estudo (presença das mutações C282Y e H63D) e o desfecho clínico (resposta virológica ao tratamento com IFN + RBV e características dos pacientes com e sem as mutações do gene HFE).

3.1 Pacientes

Foram selecionados 44 pacientes para o estudo de acordo com os seguintes critérios:

- Critérios de inclusão:

- a) Ambos os sexos
- b) Idade acima de 18 anos
- c) RNA-VHC positivo
- d) Genótipo 2 ou 3 do VHC

- e) Biópsia hepática com hepatite crônica ou cirrose
- f) Ferritina sérica >500 ng/ml
- g) Tratamento padrão com IFN + RBV
- h) Assinatura de termo de consentimento livre e esclarecido

- Critérios de exclusão:

- a) Outras causas de hepatopatia, exceto HH
- b) Insuficiência renal
- c) HIV positivo
- d) Evidência de carcinoma hepatocelular
- e) Hepatopatia descompensada
- f) Tratamento inadequado com IFN + RBV
- g) Não consentimento

Dos 44 pacientes, 40 (91%) eram homens e 4 (9%) mulheres. A idade variou de 26 a 63 anos, sendo que a média foi de 48,4 anos, com desvio-padrão de 7,7 anos. Em relação à cor, todos eram brancos. Quanto ao genótipo do VHC, 38 (86%) tinham genótipo 3 e 6 (14%) tinham genótipo 2. A análise histológica do escore da fibrose hepática revelou o seguinte estadiamento: 28 pacientes (64%) com cirrose (Metavir F4); 5 pacientes (11%) com numerosos septos e fibrose em ponte, sem cirrose (Metavir F3); 1 paciente (2%) com expansão fibrosa dos espaços-porta e raros septos (Metavir F2); 8 pacientes (18%) com expansão fibrosa dos espaços-porta, sem septos (Metavir F1) e 2 pacientes (4%) sem fibrose (Metavir F0). Nenhum paciente apresentou critério histológico para diagnóstico de HH.

Todos os pacientes possuíam resultado de ferritina sérica pré-tratamento, sendo a média de 1.097 ± 552 ng/ml (variação: 500 a 2.865). Dos 44 pacientes, 36 possuíam resultado de saturação da transferrina pré-tratamento, sendo a média de $51\% \pm 18\%$ (variação: 25% a 86%). Quanto a ALT, todos pacientes apresentavam níveis séricos elevados pré-tratamento, sendo a média de 230 ± 120 UI/l (variação: 55 a 516).

3.2 Métodos

O tamanho da amostra necessário para estabelecer diferença estatisticamente significativa na resposta virológica ao tratamento com IFN + RBV em pacientes com hepatite crônica C com e sem mutações C282Y e/ou H63D foi estimado em 42 indivíduos, compreendendo 28 sem as mutações (não-expostos) e 14 com as mutações (expostos). Estes cálculos foram realizados no programa StatCalc do Epi-Info (versão 3.2.2 de 14 de abril de 2004), baseados em estudo piloto com 15 pacientes, considerando-se as seguintes variáveis: intervalo de confiança de 95%; poder do estudo de 80%; relação não expostos/expostos 2:1; diferença de RVS entre os grupos com e sem as mutações estimada em 40% (40% de RVS nos não-expostos vs 0% nos expostos).

Todos os pacientes possuíam fragmento de biópsia hepática percutânea adequado (>5 espaços-porta) obtido no máximo seis meses antes do início do tratamento. A análise histológica foi efetuada por patologista experiente, cego para os resultados do polimorfismo do gene HFE e para os resultados de ferritina

e saturação da transferrina. Foram utilizadas as colorações de hematoxilina-eosina, vermelho picrossírius (para colágeno) e azul da Prússia (para ferro).

A classificação histológica empregada para o estadiamento da hepatite crônica C foi a do componente de fibrose (F) do escore Metavir (BEDOSSA, 1993; THE METAVIR COOPERATIVE GROUP, 1994; BEDOSSA & POYNARD, 1996), composta pelos seguintes estágios: FO = sem fibrose; F1 = fibrose portal sem septos; F2 = fibrose portal com raros septos; F3 = fibrose portal com numerosos septos, sem cirrose, e F4 = cirrose. A coloração do azul da Prússia foi empregada para detecção histológica do ferro hepático, com atenção para o compartimento predominante (células de Kupffer ou hepatócitos), segundo Scheuer (SCHEUER et al, 1991).

O diagnóstico da infecção crônica pelo VHC foi confirmado em todos os pacientes pela detecção do RNA do VHC sérico por PCR qualitativo (método *in house*; Simbios Biotecnologia, ULBRA, Canoas, RS; limite de detecção de 50 UI/ml). Em resumo, RNA foi extraído de 100 microlitros de plasma pelo método guanidina-fenol-clorofórmio (CHOMCCZYNSKI & SACCHI, 1987). A seguir, o RNA foi submetido à transcrição reversa a 37°C por 30 minutos, usando 75 mM de KCl, 50 mM de tris-HCl (pH 8,3), 3 mM de MgCl₂, 2,5 mM de DTT, 1 mM de dNTPs, 20 unidades da enzima de transcrição reversa do vírus da leucemia murina (Gibco BRL Life Technologies, EUA), 8 unidades da enzima RNasin (Promega Corp., EUA), 2 µM de iniciador “antisense” para região 5' não-codificante do VHC e 3 µl de RNA. A amplificação foi feita com 10 µl de DNA complementar, 10 mM de tampão tris-HCl (pH 8,3), 1,5 mM de MgCl₂, 50 mM de KCl, 0,2 mM de dNTPs, 2 µM de iniciador “senso” para região 5' não-codificante

do VHC e 1,5 unidades da Taq DNA polimerase (Centro de Biotecnologia, UFRGS, Brasil). A amplificação foi feita por 35 ciclos em termociclador (MJ Research PTC-100, EUA) com as seguintes temperaturas e tempos: 94°C por 30 segundos, 50°C por 30 segundos e 72°C por 60 segundos, com passo final de extensão de 72°C por 7 minutos. Os produtos foram separados por eletroforese em gel de agarose e visualizados pela coloração de brometo de etídio. O tamanho do produto da reação de transcrição reversa seguida de PCR foi de 325 pares de bases. Todas amostras foram submetidas a segunda amplificação (*nested* PCR) com iniciadores internos para confirmar os resultados. Amostras positivas e negativas foram adicionadas como controles.

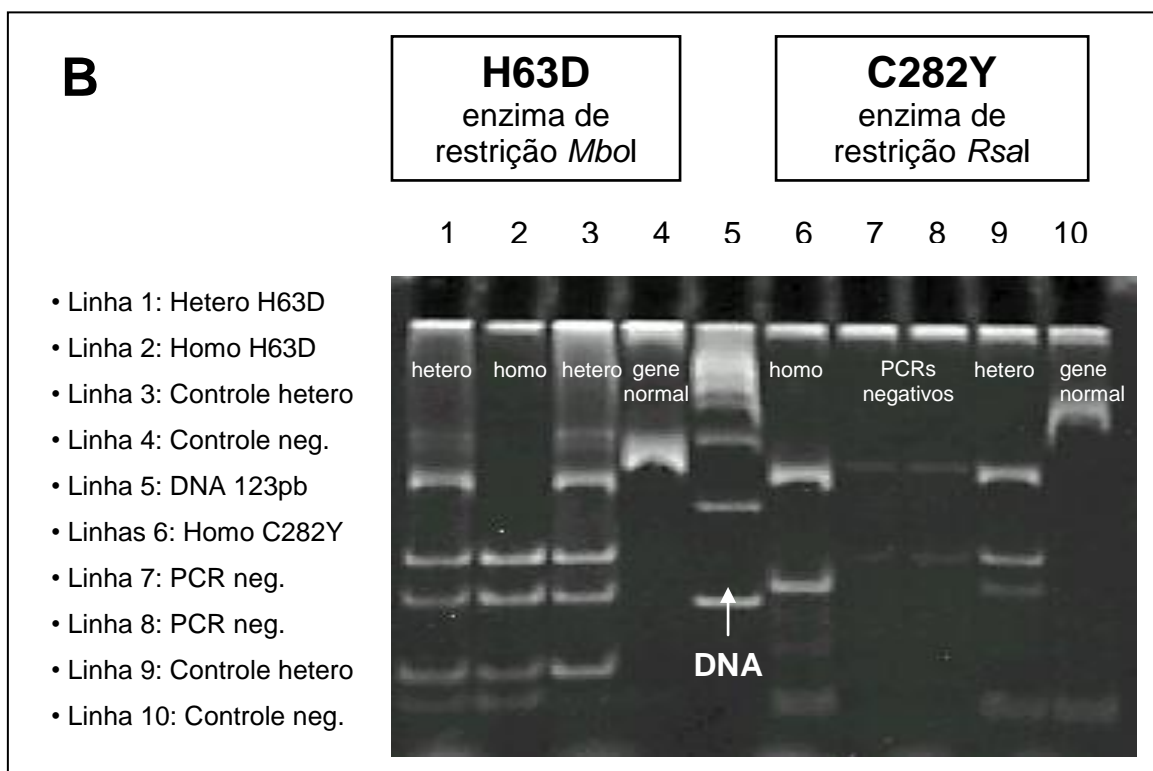
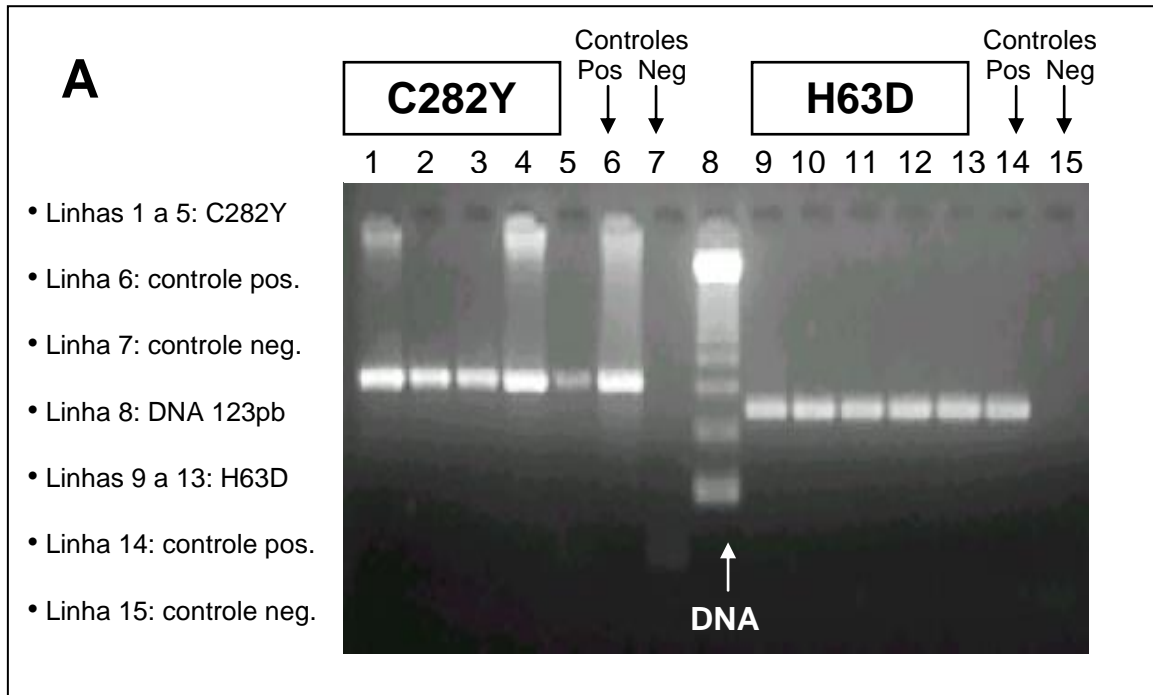
A genotipagem foi realizada por RFLP (Simbios Biotecnologia, ULBRA, Canoas, RS), segundo o método descrito por McOmish et al (McOMISH et al, 1994), empregando o produto externo da reação de PCR para aplicação do método de restrição. Em resumo, alíquota de 5 µl do produto externo da reação de PCR foi digerida com 1 unidade de cada da enzima RsaI e HaeIII em tampão apropriado por 1,5-2 horas a 37°C, juntamente com 1 unidade de cada da enzima BstNI e HinfI em tampão apropriado por 1,5 horas a 37°C e mais 1,5 horas a 60°C. O produto digerido foi separado por eletroforese em 12,5% de gel de poliacrilamida, sendo visualizado por coloração com prata (SANGUINETTI et al, 1994). Os padrões de banda dos diferentes genótipos do VHC foram deduzidos a partir das seqüências publicadas (McOMISH et al, 1994) e daquelas obtidas da base de dados de genes (*Genebank*, EUA). Amostras com genótipos identificados foram adicionadas como controles.

A determinação do polimorfismo do gene HFE foi realizada por RFLP, no Laboratório Amplicon (Porto Alegre, RS). Em resumo, amostra de 4 ml de sangue

em meio EDTA foi obtida após assinatura do termo de consentimento informado. A extração do DNA foi realizada em três passos, iniciando com a lise da membrana celular por meio do detergente "TKM1", seguida da lise e precipitação da membrana nuclear utilizando-se o detergente "TKM2" e NaCl. A seguir, 50 microlitros do DNA foram submetidos a reação de PCR (figura 3A) com uma temperatura de anelamento de 60°C, utilizando iniciadores compostos de oligonucleotídeos específicos para regiões flanqueando os códons 282 e 63 do gene HFE e condições de clivagem descritas por Feder et al (FEDER et al, 1996).

Os alelos das mutações C282Y e H63D foram detectadas pela técnica de RFLP (figura 3B), visando estabelecer o estado de homocigoto ou heterocigoto por meio da aplicação de enzimas de restrição. Para melhor detecção da mutação H63D, o iniciador "antisense" da reação de PCR foi deslocado para permitir a inclusão de um segundo local de restrição *Mbol* (Invitrogen, Life Technologies, EUA), criando assim um controle interno de clivagem conforme sugerido pelo grupo inglês de estudo da HH (THE UK HAEMOCHROMATOSIS CONSORTIUM, 1997). Para a mutação C282Y foi utilizado 10 microlitros do produto amplificado com 10 unidades de *RsaI* (Invitrogen, Life Technologies, EUA) em tampão adequado (React 3, Invitrogen Life Technologies EUA) por 2 horas à 37°C. Para mutação H63D, também foi usada 10 microlitros de produto amplificado em 10 unidades de *Mbol* (Invitrogen, *Life Technologies*, EUA) em tampão por 2 horas a 37°C. Após a digestão dos produtos, o material foi submetido à eletroforese em gel de poliacrilamida 12,5%, com controles positivos e negativos, sendo visualizado por coloração com nitrato de prata (SANGUINETTI et al, 1994).

Figura 3A/B. Detecção das mutações C282Y e H63D por PCR (A) e RFLP (B).



Todos pacientes foram tratados com IFN convencional + RBV, fornecidos pela Secretaria da Saúde do Estado do Rio Grande do Sul (SES/RS), seguindo as normas das Portarias 639 (Portaria GM/MS 639/00, 2000) e 863 (Portaria GM/MS 863/02, 2002). O protocolo de tratamento utilizado em todos os pacientes incluídos baseou-se no uso de IFN alfa-2a ou alfa-2b (diferentes marcas comerciais fornecidas pela SES/RS), na dose de três milhões de unidades, três vezes por semana, por via subcutânea, associado a RBV (diferentes marcas comerciais fornecidas pela SES/RS), na dose de 1.000 a 1.250 mg/dia (de acordo com o peso do paciente <75 kg ou ≥75 kg, respectivamente), por via oral.

A duração do tratamento foi de no mínimo seis meses, conforme recomendado para pacientes com genótipos 2 e 3 do VHC. O tratamento foi interrompido em pacientes com PCR positivo no sexto mês de tratamento, sendo estes considerados não-respondedores.

Foram incluídos no presente estudo apenas os pacientes que realizaram o tratamento de forma adequada, definida como uso acima de 80% da dose preconizada de IFN e RBV, por mais de 80% do tempo preconizado de tratamento. Utilizando-se o PCR qualitativo (limite de detecção de 50 UI/ml), foram considerados cinco tipos diferentes de resposta virológica:

- Resposta virológica ao final do tratamento (RVFT) – RNA do VHC negativo por ao final do tratamento;
- Resposta virológica sustentada (RVS) - RNA do VHC negativo seis meses ou mais após o término do tratamento;
- Não respondedor (NR) - RNA do VHC positivo no sexto mês do tratamento;
- Escape (ESC) - Retorno de positividade do RNA do VHC ainda durante o tratamento, em paciente que já havia apresentado resultado negativo;

- Recidiva (REC) - Retorno de positividade do RNA do VHC após o tratamento em paciente que já havia apresentado resultado negativo ao final do tratamento;

Os níveis séricos de ferro foram medidos pelo método da Ferrozina (*Roche Diagnostics*, Mannheim, Alemanha) em analisador automático (Hitachi 917, Hitachi, Tokyo, Japão) calibrado de acordo com a referência internacional padrão 80/578 da Organização Mundial da Saúde. A ferritina e a transferrina foram determinadas pelo método imuno-nefelométrico (*N latex ferritin resp. N antisera to human transferrin*, Dade Behring, Marburg, Alemanha) em analisador automático (Behring Nephelometer Ila, Dade Behring, Marburg, Alemanha). A saturação da transferrina foi calculada por meio da seguinte fórmula: ferro sérico x 70,9 / transferrina sérica (valor normal: 16–45%). Valores normais para ferritina, expressos em ng/mL, foram: 20–280 para homens e 10–140 para mulheres <45 anos e 25–250 para mulheres ≥45 anos. ALT e AST séricas foram medidas por método fotolorimétrico padrão, com valor superior da normalidade para ambas de 40 UI/l para homens e 35 UI/l para mulheres.

Foram excluídos pacientes com insuficiência renal (creatinina sérica >1,5 mg/dl), pacientes com anticorpo reagente contra o vírus da imunodeficiência humana (anti-HIV) e pacientes com outras causas de hepatopatia, exceto HH, de acordo com os seguintes critérios: a) hepatopatia alcoólica, definida pelo consumo de bebidas alcoólicas acima de 100 gramas por semana nos últimos 5 anos e histologia hepática sugestiva; b) co-infecção com o vírus da hepatite B (VHB) definida pela presença de positividade para o antígeno de superfície (HBsAg) do vírus B; c) hepatopatia autoimune, definida pela presença de autoanticorpos (fator antinuclear e/ou anti-músculo liso) acima de 1:80 e achado de infiltrado predominante de plasmócitos na análise histológica; d) doença de Wilson,

definida pelo achado de ceruloplasmina abaixo de 20 mg/dL em pacientes com idade inferior a 45 anos e histologia hepática sugestiva; e) deficiência de alfa-1-antitripsina, definida pela dosagem de alfa-1-antitripsina sérica abaixo de 100 mg/dL e histologia compatível; f) hepatotoxicidade medicamentosa, definida pela história clínica de uso de drogas hepatotóxicas nos últimos seis meses e histologia compatível; g) carcinoma hepatocelular, definido pelo achado de lesão focal hepática à ultrassonografia com histologia compatível e/ou alfa-fetoproteína acima de 400ng/ml e/ou nódulo hepático com captação de contraste na fase arterial de tomografia computadorizada helicoidal trifásica, indicando hipervascularização arterial.

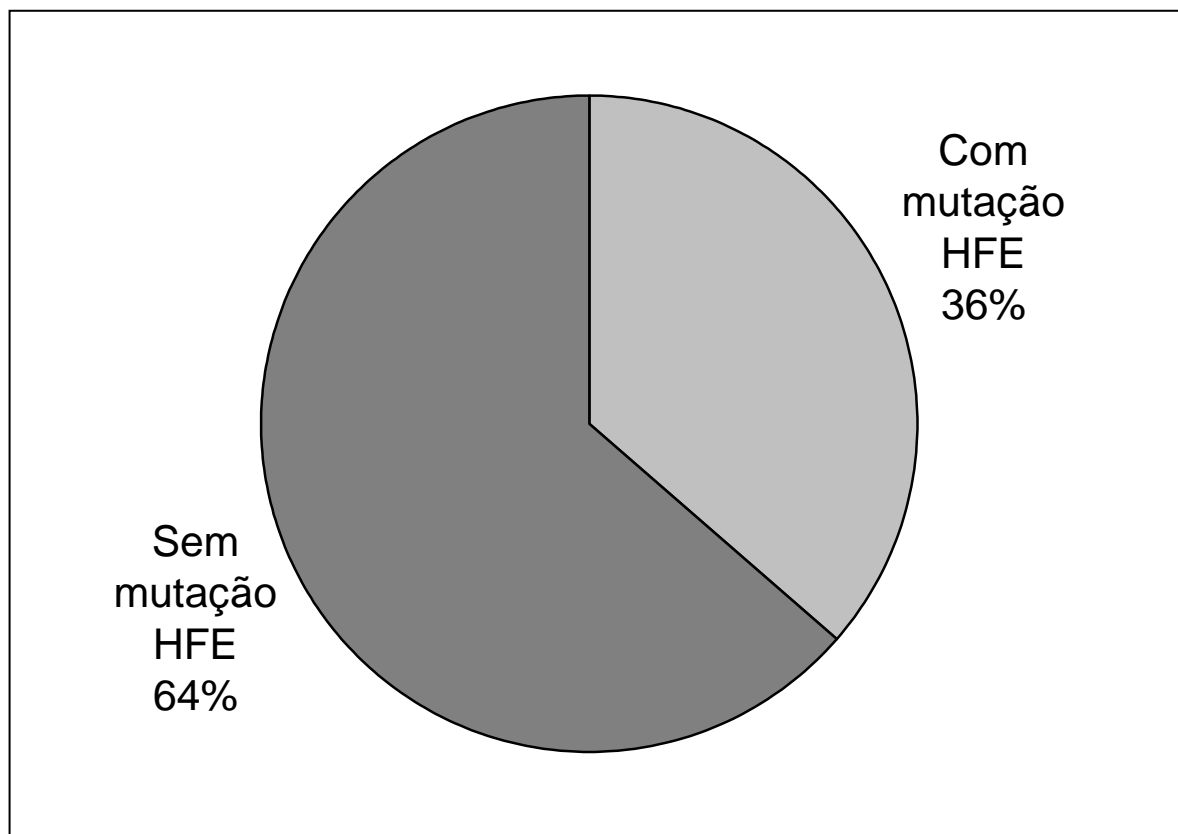
Do ponto de vista estatístico, inicialmente, foram obtidas tabelas de frequência para todas as variáveis do banco de dados. As variáveis quantitativas foram descritas por meio da média e desvio-padrão, enquanto que nas qualitativas utilizou-se o percentual. Os resultados foram avaliados por testes não-paramétricos. O teste Exato de Fisher foi usado para comparar proporções entre variáveis categóricas e o teste de Kruskal-Wallis foi usado para comparar médias entre variáveis quantitativas. Adicionalmente, utilizou-se o coeficiente de correlação linear de Pearson na avaliação da associação entre variáveis quantitativas. O nível de significância estatística adotado foi de $\alpha = 0,05$. Os dados foram processados e analisados com auxílio do programa "SPSS for windows". O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) e pela Comissão Nacional de Pesquisa (CONEP).

4. RESULTADOS

Os dados demográficos, laboratoriais e histológicos dos pacientes da presente casuística, bem como a distribuição das mutações do gene HFE e o tipo de resposta ao tratamento com IFN + RBV, podem ser analisados no anexo A.

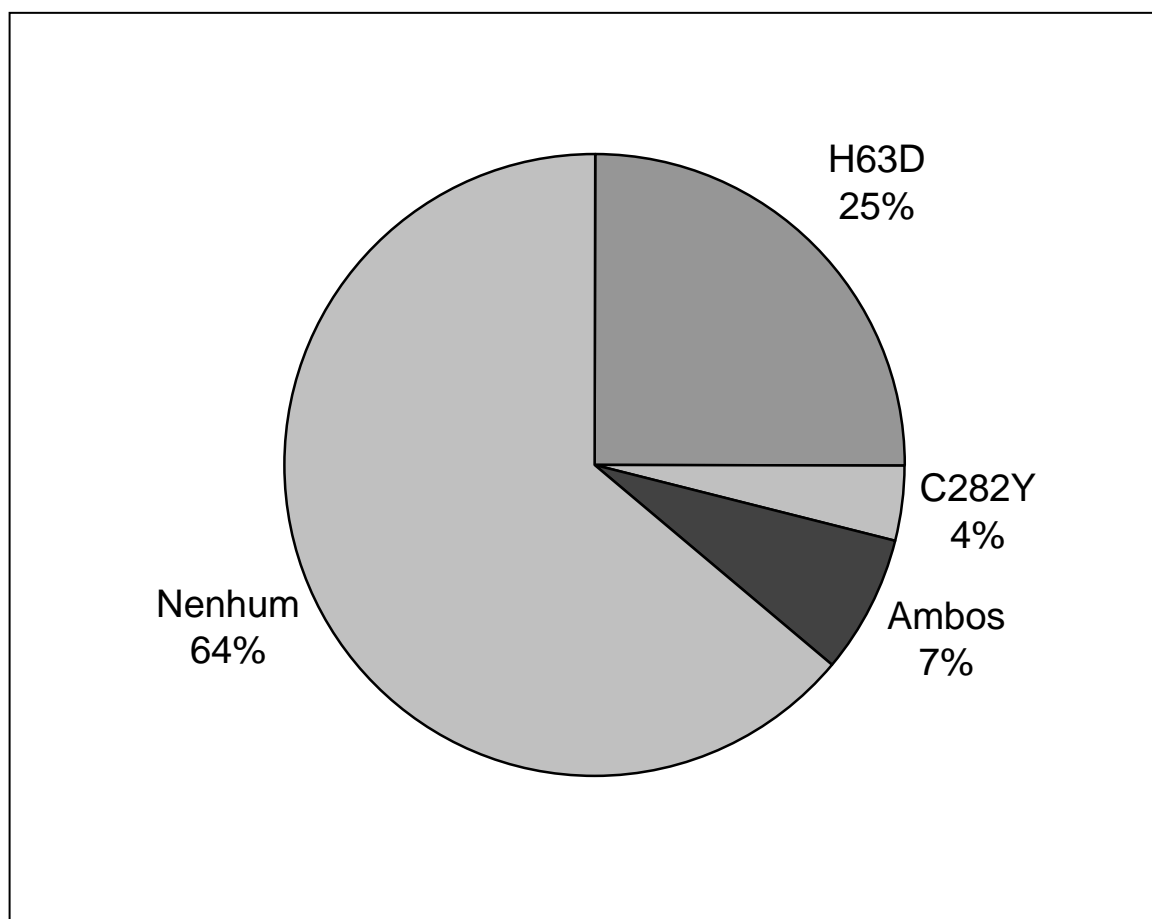
Avaliando a prevalência das mutações do gene HFE nos 44 pacientes com infecção crônica pelo genótipo 2 ou 3 do VHC e ferritina >500 mg/dl, verificou-se que 28 pacientes (64%) não apresentavam mutações do gene HFE, enquanto 16 pacientes (36%) foram heterozigotos para uma ou ambas as mutações (figura 4).

Figura 4. Prevalência das mutações do gene HFE em 44 pacientes com hepatopatia crônica pelo genótipo 2 ou 3 do vírus C e ferritina acima de 500 ng/dl.



Em relação ao grupo total de 44 pacientes, os 16 portadores de mutações do gene HFE estavam assim distribuídos (figura 5): heterozigotos H63D: 11 casos (25%); heterozigotos C282Y: 2 casos (4%) e heterozigotos compostos H63D + C282Y: 3 casos (7%). Nenhum paciente foi homozigoto para qualquer das mutações.

Figura 5. Distribuição dos 16 pacientes com mutações do gene HFE



Dos 44 pacientes, 39 foram tratados por seis meses e cinco usaram a estratégia “à la carte” e foram tratados por 12 meses, sendo dois pertencentes ao grupo de 16 indivíduos com mutações HFE e três pertencentes ao grupo de 28 indivíduos sem mutações HFE.

Comparando-se as características demográficas, laboratoriais e histológicas, bem como a resposta ao tratamento antiviral, dos 16 pacientes com alguma ou ambas mutações do gene HFE *versus* os 28 pacientes sem qualquer das mutações do gene HFE, encontrou-se os seguintes resultados, resumidos na tabela 6:

Tabela 6. Características demográficas, laboratoriais, histológicas e de resposta ao tratamento com interferon + ribavirina em 44 pacientes portadores de hepatopatia crônica pelo vírus C com e sem mutação do gene HFE.

PARÂMETRO	COM HFE N = 16	SEM HFE N = 28	P
Média de idade (anos \pm DP)	50 \pm 6	48 \pm 8	0,33
Sexo masculino	15 (94%)	25 (89%)	0,54
Genótipo 3	14 (88%)	24 (86%)	0,62
ALT pré-tto (média \pm DP; UI/l)	221 \pm 88	239 \pm 138	0,66
FER pré-tto (média \pm DP; ng/dl)	1.171 \pm 587	1.060 \pm 546	0,68
SAT pré-tto (média \pm DP)	57% \pm 18%*	46% \pm 17%**	0,06
Fibrose em ponte (Metavir F3)	2 (13%)	3 (11%)	0,62
Cirrose (Metavir F4)	10 (63%)	18 (64%)	0,66
Tratamento por 12 meses n (%)	2 (13%)	3 (11%)	0,71
Resposta virológica final do tto.	25%	64%	0,03
Resposta virológica sustentada	0%	39%	0,003

HFE = mutação do gene HFE; DP = desvio padrão; P = significância estatística; ALT = alanina aminotransferase; FER = ferritina sérica; SAT = saturação da transferrina; tto. = tratamento.
*Dados disponíveis em 14/16 pacientes; **Dados disponíveis em 22/28 pacientes.

A RVS ocorreu em 11 (25%) dos 44 pacientes. Quanto aos grupos com e sem RVS, verificou-se que um dos 11 casos com RVS foi tratado por 12 meses, comparado com quatro dos 33 casos sem RVS.

Comparando-se os 11 pacientes com RVS com os 33 pacientes sem RVS quanto as suas características demográficas, laboratoriais, histológicas e genéticas (mutações do gene HFE), encontrou-se os seguintes resultados, resumidos na tabela 7:

Tabela 7. Características demográficas, laboratoriais, histológicas e genéticas dos pacientes portadores de hepatopatia crônica pelo vírus C com e sem resposta virológica sustentada ao tratamento com interferon + ribavirina.

PARÂMETRO	COM RVS N = 11	SEM RVS N = 33	P
Média de idade (anos \pm DP)	48 \pm 11	49 \pm 7	0,89
Sexo masculino	10 (91%)	30 (91%)	0,70
Genótipo 3	8 (73%)	30 (91%)	0,62
ALT pré-tto (média \pm DP; UI/l)	244 \pm 170	225 \pm 102	0,66
FER pré-tto (média \pm DP; ng/dl)	1.158 \pm 634	1.076 \pm 531	0,68
SAT pré-tto (média \pm DP)	48% \pm 17%*	52% \pm 18%**	0,54
Fibrose em ponte (Metavir F3)	1 (9%)	4 (12%)	0,64
Cirrose (Metavir F4)	8 (73%)	20 (61%)	0,75
Tratamento por 12 meses n (%)	1 (9%)	4 (12%)	0,82
Mutação C282Y e/ou H63D	0 (0%)	16 (48%)	0,003

HFE = mutação do gene HFE; DP = desvio padrão; P = significância estatística; ALT = alanina aminotransferase; FER = ferritina sérica; SAT = saturação da transferrina; tto. = tratamento.

*Dados disponíveis em 10/11 pacientes; **Dados disponíveis em 26/33 pacientes.

Nenhum dos 16 pacientes pertencentes ao grupo com mutações HFE apresentou RVS, enquanto que 11 (39,3%) dos 28 pacientes pertencentes ao grupo sem mutações HFE apresentaram RS ($P = 0,0028$; Teste Exato de Fisher). A acurácia da presença das mutações do gene HFE para a ocorrência de RVS encontra-se resumida na figura 6.

		Ausência de resposta virológica sustentada	
		Sim	Não
Mutações do gene HFE	Sim	16 (a)	0 (b)
	Não	17 (c)	11 (d)

Figura 6. Acurácia das mutações do gene HFE para a ocorrência de resposta virológica sustentada

- Sensibilidade = $a/a+c$ ($16/16+17$) = 48%
- Especificidade = $d/b+d$ ($11/11$) = 100%
- Valor preditivo positivo = $a/a+b$ ($16/16+0$) = 100%
- Valor preditivo negativo = $d/c+d$ ($11/17+11$) = 39%

A acurácia da saturação da transferrina para o achado de mutações HFE foi analisada em 36 pacientes que apresentavam esse dado no prontuário e encontra-se resumida na figura 7. Em 21 destes 36 pacientes (58%), o resultado foi superior a 45%. Utilizando-se esse valor como ponto de corte, verificou-se que 10 (48%) dos 21 pacientes com nível sérico de saturação da transferrina acima de 45% possuíam mutação HFE, enquanto que apenas quatro (27%) dos 15 pacientes com nível sérico de saturação da transferrina inferior a 45% eram mutantes HFE. O risco relativo da saturação elevada para o achado de mutação HFE foi calculado em 1,43 (intervalo de confiança de 95%: 0,84 a 2,43; $P = 0,36$).

		Mutações C282Y e/ou H63D do gene HFE	
		Sim	Não
Saturação da transferrina acima de 45%	Sim	10 (a)	11 (b)
	Não	04 (c)	11 (d)

Figura 7. Acurácia da saturação da transferrina para mutações HFE

- Sensibilidade = $a/a+c$ ($10/10+04$) = 71%
- Especificidade = $d/b+d$ ($11/11+11$) = 50%
- Valor preditivo positivo = $a/a+b$ ($10/10+11$) = 48%
- Valor preditivo negativo = $d/c+d$ ($11/4+11$) = 73%

5. DISCUSSÃO

O VHC acomete cerca de 3% da população mundial, totalizando mais de 200 milhões de portadores crônicos (National Institutes of Health, 2002). A infecção torna-se persistente em cerca de 80% dos casos, com potencial de progressão para cirrose, insuficiência hepática e carcinoma hepatocelular (ALBERTI et al, 1999). O tratamento fundamenta-se na combinação de IFN (convencional ou peguilado) + RBV, erradicando o vírus em aproximadamente 50% dos casos (STRADER et al, 2004). Na ausência de novos esquemas terapêuticos, projeções epidemiológicas estimam, para as próximas duas décadas, aumento de cinco a sete vezes na ocorrência de carcinoma hepatocelular e na necessidade de transplante hepático relacionado à infecção pelo VHC (DAVIS et al, 2003).

Vários estudos recentes (TANAKA et al, 2000; GRAMENZI et al, 2001; KASAHARA et al, 2004; VELDT et al, 2004), incluindo algumas metanálises (POYNARD et al, 1999; CAMMA et al, 2004), sugerem que a resposta sustentada ao tratamento de pacientes com hepatopatia crônica pelo VHC modifica a história natural da doença, diminuindo a mortalidade e/ou a incidência do carcinoma hepatocelular.

O conhecimento dos fatores preditivos de resposta ao tratamento antiviral da hepatite C poderia auxiliar no desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas, visando aumentar o percentual de RVS. Nesse sentido, no presente estudo, procurou-se estabelecer a prevalência de mutações do gene HFE em

pacientes com hepatopatia crônica causada pelos genótipos 2 ou 3 do VHC e ferritina elevada, bem como avaliar a possível relação dessas mutações com o percentual de RVS ao tratamento com IFN + RBV.

Em relação à prevalência das mutações HFE em pacientes com hepatite crônica C, vários estudos têm demonstrado frequência semelhante a controles VHC negativos (SMITH et al, 1998; PIPERNO et al, 1998; HEZODE et al, 1999; KAZEMI-SHIRAZI et al, 1999; ERHARDT et al, 2003; GEHRKE et al, 2003; EISENBACH et al, 2004).

Nesse sentido, Hezode et al (HEZODE et al, 1999), estudando 209 pacientes franceses com hepatite crônica C, encontraram 11% de heterozigotos C282Y e 24% de heterozigotos H63D. Dados da população geral francesa mostraram prevalência semelhante de heterozigotos do gene HFE, variando entre 8% a 14% para a mutação C282Y e 23% a 26% para a mutação H63D (HANSON et al, 2001).

Da mesma maneira, Smith et al (SMITH et al, 1998), estudando 137 pacientes com hepatite crônica C na Inglaterra, identificou 7% de heterozigotos C282Y, enquanto os dados da população inglesa mostram frequência variando entre 6% a 8% para essa mutação.

Resultados concordantes também foram obtidos por Piperno et al (PIPERNO et al, 1998), ao estudarem 110 pacientes italianos com hepatite crônica B e C, comparados com 139 controles, sem notar diferença significativa entre os grupos quanto a frequência das mutações.

Na Áustria, Kazemi-Shirazi et al (KAZEMI-SHIRAZI et al, 1999) também compararam a prevalência das mutações C282Y e H63D em 184 pacientes com hepatite crônica C *versus* 487 controles, encontrando mutações C282Y e H63D,

respectivamente, em 7% e 12% dos VHC positivos *versus* 5% e 11% nos VHC negativos ($P>0,05$).

Na Alemanha, dois estudos independentes (ERHARDT et al, 2003; GEHRKE et al, 2003) chegaram à mesma conclusão. No primeiro, Erhardt et al (ERHARDT et al, 2003) analisaram 401 pacientes com hepatite crônica C e 295 controles saudáveis, sem encontrar diferença significativa na frequência dos alelos das mutações C282Y e H63D entre os pacientes VHC positivos e negativos (7% versus 6% para C282Y; 15% versus 16% para H63D, respectivamente). No segundo estudo, Gehrke et al (GEHRKE et al, 2003) incluíram 246 pacientes VHC positivos e 200 doadores de sangue VHC negativos, também sem encontrar diferença significativa entre os grupos quanto a prevalência do polimorfismo do gene HFE.

No Brasil existem poucos estudos publicados comparando a prevalência do polimorfismo do gene HFE entre pacientes com hepatite crônica C e indivíduos da população geral. No estudo de Martinelli et al (MARTINELLI et al, 2000), realizado em Ribeirão Preto, os autores investigaram a prevalência de mutações do gene HFE em 135 pacientes não selecionados com hepatite crônica C. Foram encontrados 4% de heterozigotos C282Y e 24% de heterozigotos H63D, sendo essa frequência semelhante à encontrada no grupo controle sem hepatite C.

O fato dos pacientes por nós estudados terem sido incluídos neste trabalho a partir do achado de ferritina elevada poderia fazer supor que encontraríamos maior prevalência das mutações do gene HFE, em comparação com estudos que analisaram pacientes com hepatite crônica C não selecionados por critérios específicos de sobrecarga de ferro.

Porém, encontramos frequência semelhante à descrita por Martinelli et al (MARTINELLI et al, 2000), sendo 4% de heterozigotos C282Y, 25% de heterozigotos H63D e 7% de heterozigotos compostos. Embora não existam dados sobre a prevalência do polimorfismo HFE na população geral em nosso meio, verifica-se que a frequência de mutações encontrada nesta casuística é superponível a maioria dos dados publicados no Brasil e no exterior.

Assim, a análise dos resultados indica não haver diferença significativa no percentual de mutações do gene HFE entre pacientes VHC positivos e a população geral. Essa conclusão significa apenas que ser portador dessa alteração genética não torna os indivíduos carreadores mais suscetíveis a infecção pelo VHC ou a sua cronificação.

Na verdade, o achado deste polimorfismo genético em percentual significativo dos pacientes com hepatite crônica C já era esperado, em vista da prevalência global de heterozigotos para o gene HFE na população geral de diversos países variar entre 5% e 10% para a mutação C282Y e entre 6% e 30% para a mutação H63D (MERRYWEATHER-CLARKE et al, 1997).

A grande quantidade de estudos comprovando prevalência semelhante das mutações C282Y e H63D, entre pacientes com hepatite crônica C e indivíduos VHC negativos na população geral, constitui forte argumento contra a existência de qualquer papel das mutações do gene HFE como fator genético favorecedor do contágio pelo VHC (EISENBACH et al, 2004).

Em relação ao significado clínico da presença do polimorfismo do gene HFE em pacientes infectados pelo VHC, estudos recentes salientam o possível papel das mutações C282Y e H63D como fator acelerador da progressão da hepatite crônica C para cirrose e carcinoma hepatocelular, provavelmente pela

maior sobrecarga de ferro comumente encontrada nesses pacientes (TUNG et al, 2003; EISENBACH et al, 2004).

Nesse sentido, sabe-se que o ferro apresenta potencial de hepatotoxicidade. Esse íon é armazenado no fígado, ligado a ferritina, formando complexo que impede seu contato direto com o parênquima hepático. Quando a capacidade de ligação da ferritina é excedida, o ferro ionizado livre acumula-se diretamente nos tecidos (TRINDER et al, 2002; FLEMING et al, 2004).

O ferro, uma vez livre do ambiente protegido fornecido pela ligação com a ferritina, cataliza a formação de espécies reativas de oxigênio, as quais danificam a membrana lipoproteica dos hepatócitos e liberam enzimas lisossomiais que terminam por provocar necrose hepatocitária (EATON, 2002) e dano ao DNA celular (EISENBACH et al, 2004).

Além disso, tem sido comprovado efeito fibrogênico direto do ferro, por meio da ativação das células hepáticas estreladas, principais produtoras de colágeno no fígado (PIETRANGELO, 1996; RAMM et al, 1997; MARTINELLI et al, 2004).

Existem muitas evidências apontando para o fato de que pacientes portadores de polimorfismo do gene HFE acumulam ferro em excesso no fígado, potencializando o dano hepático em hepatopatias de diversas etiologias, além da própria HH, incluindo porfiria cutânea tarda (STUART et al, 1998; SAMPIETRO et al, 1998; MARTINELLI & ZAGO, 2000), esteatohepatite não-alcoólica (BONKOVSKY et al, 1999) e lesão por agentes químicos, tais como o álcool ou o tetracloreto de carbono (BONKOVSKY et al, 2003).

Na hepatite crônica C é freqüente o achado de acúmulo de ferro na análise histológica do fígado, especialmente em pacientes com ferritina elevada (Di

BISCEGLIE et al, 1992; FARINATI et al, 1995; BOUCHER et al, 1997; BONKOVSKY et al, 1997; BARBARO et al, 1999).

Tanto a ferritina sérica quanto o acúmulo de ferro no tecido hepático tendem a aumentar na medida em que a fibrose progride, sendo maiores nos pacientes com cirrose bem estabelecida (BEINKER et al, 1996; LUDWIG et al, 1997; COTLER et al, 1998).

Contudo, esse achado não indica necessariamente relação de causa e efeito, podendo ocorrer depósito de ferro simplesmente em consequência do aumento do processo necro-inflamatório que precede a fibrogênese (IOANNOU et al, 2002; EISENBACH et al, 2004). Nesse sentido, sabe-se que a medida da ferritina sérica, apesar de útil na avaliação da sobrecarga de ferro, pode gerar resultados falsos-positivos para excesso de ferro na vigência de processos inflamatórios sistêmicos, por ser marcador de fase aguda (GUYADER et al, 1998).

Por essa razão, a saturação da transferrina poderia ser considerada teste de triagem mais fidedigno do que a ferritina para o diagnóstico de acúmulo de ferro (ADAMS, 2000; CRAWFORD, 2000, BONFORD, 2002). No entanto, no presente estudo, optamos por incluir os pacientes com hepatite crônica C baseados no critério de elevação da ferritina sérica, por ser o teste que tem sido associado na literatura com má resposta ao tratamento antiviral (DISTANTE et al, 2002; HOFER et al, 2004; LEBRAY et al, 2004; EISENBACH et al, 2004), embora outros autores não tenham verificado essa relação (PIANKO et al, 2002).

Além disso, a medida direta dos níveis séricos da saturação da transferrina requer análise imunológica, com alto custo e falta de padronização, tendo de ser usualmente estimada de forma indireta, a partir de fórmula matemática (ADAMS, 2000; CRAWFORD, 2000).

Outro motivo para preferirmos a dosagem da ferritina como fator de inclusão nesse estudo reside no fato de que o ponto de corte da saturação da transferrina para acúmulo de ferro não está ainda bem estabelecido. Utilizando-se níveis acima de 50% para mulheres e acima de 60% para homens, esse teste revelou sensibilidade de 92%, especificidade de 93% e valor preditivo positivo de 86% para o diagnóstico de HH (EDWARDS et al, 1988; BORWEIN et al, 1984; BASSETT et al, 1984).

Em contrapartida, estudos mais recentes indicam que a mudança do ponto de corte da saturação de transferrina sérica para valores acima de 45%, independente do gênero masculino ou feminino, seria capaz de detectar praticamente 100% dos indivíduos homozigotos C282Y em uma população, porém englobaria cerca de 30% a 60% de indivíduos heterozigotos ou sem qualquer mutação conhecida do gene HFE da HH, comprometendo seriamente a especificidade do teste (MCLAREN et al, 1998; OLYNYK et al, 1999).

No presente estudo, verificou-se que 36 dos 44 pacientes estudados apresentavam resultado de saturação de transferrina disponível no prontuário. Em 21 destes 36 pacientes (58%), o resultado foi superior a 45%. Utilizando esse valor como ponto de corte verificou-se que 10 (48%) dos 21 pacientes com nível sérico de saturação da transferrina acima de 45% possuíam mutação HFE, enquanto que apenas quatro (27%) dos 15 pacientes com nível sérico de saturação da transferrina inferior a 45% eram mutantes HFE.

Embora esse resultado revele tendência a maior percentual de carreadores do polimorfismo HFE entre pacientes com hepatite crônica C e saturação da transferrina acima de 45%, a sensibilidade da saturação da transferrina para o achado das mutações HFE foi de apenas 71% com especificidade ainda menor,

da ordem de 50%. A baixa especificidade desse método para o diagnóstico da presença do polimorfismo do gene HFE, pelo menos no que diz respeito ao estado de heterozigoto simples ou composto, limita seu uso como marcador indireto da presença do polimorfismo HFE nessa população.

O risco relativo da saturação elevada para o achado de mutação HFE foi calculado em apenas 1,43 (intervalo de confiança de 95%: 0,84 a 2,43) no nosso estudo, sendo considerado sem significância estatística ($P = 0,36$). Porém, no estudo da acurácia dos níveis de saturação da transferrina acima de 45% para o diagnóstico da presença de mutações HFE, o melhor resultado encontrado foi o valor preditivo negativo de 73%, indicando ser essa a probabilidade de pacientes com saturação inferior ou igual a 45% não apresentarem os polimorfismos aqui estudados do gene HFE.

Independente do teste bioquímico usado para identificar a sobrecarga de ferro, sua presença parece acarretar pior prognóstico em pacientes com hepatite crônica C, tanto em termos de maior progressão da fibrose (BEINKER et al, 1996; LUDWIG et al, 1997; COTLER et al, 1998), quanto de menor resposta ao tratamento com IFN em monoterapia (VAN THIEL et al, 1994; CLEMENTE et al, 1994; OLYNYK et al, 1995; IZUMI et al, 1996; KAGEYAMA et al, 1998; PIANKO et al, 2002).

Evidências recentes têm indicado que o ferro poderia aumentar a replicação do VHC (KAKIZAKI et al, 2000) e diminuir a atividade do sistema imunológico (BROCK & MULERO, 2000; WEISS, 2002), podendo assim influenciar a probabilidade de resposta ao tratamento com IFN e RBV.

Curiosamente, estudos mais recentes não têm encontrado relação entre índice de ferro no tecido hepático e RVS obtida com a combinação de IFN

(convencional ou peguilado) + RBV (PIANKO et al, 2002; HOFER et al, 2004; LEBRAY et al, 2004), embora alguns destes mesmos autores reconheçam que o achado de nível sérico elevado de ferritina no período pré-tratamento continue sendo fator preditivo negativo para RVS (DISTANTE et al, 2002; HOFER et al, 2004; LEBRAY et al, 2004).

No presente estudo, ao contrário do sugerido pela literatura, não se encontrou diferença significativa na média da ferritina pré-tratamento entre os pacientes com e sem RVS (1.158 ng/ml *versus* 1.076 ng/ml, respectivamente; $P=0,68$). Da mesma maneira, apesar de certa tendência a menor média de saturação da transferrina nos pacientes com RVS, não houve diferença estatística desse parâmetro em comparação com os indivíduos sem RVS (48% *versus* 52%, respectivamente; $P = 0,54$).

Talvez esse achado discrepante esteja relacionado ao fato de todos os pacientes incluídos em nosso estudo apresentarem níveis elevados de ferritina. Assim, seria difícil perceber diferença nos níveis médios de ferritina entre os grupos com e sem RVS sérica, pois todos possuíam esse parâmetro elevado. O fato da média dos níveis de saturação da transferrina encontrar-se acima do ponto de corte de 45% em ambos os grupos, com e sem RVS, sugere que exista certa correlação entre a ferritina sérica e outros marcadores séricos de sobrecarga de ferro.

Em nossa casuística, verificamos RVS em apenas 11 dos 44 pacientes (25%). O percentual de RVS global obtida nesse estudo foi nitidamente inferior ao esperado para pacientes com genótipo 2 ou 3 (STRADER et al, 2004). Dois grandes estudos multicêntricos internacionais, publicados em 1998, mostraram percentual de RVS da ordem de 69% (McHUTCHISON et al, 1998) e 64%

(POYNARD et al, 1998) nos pacientes com hepatite crônica C infectados pelo genótipo 2 ou 3 do VHC tratados por 24 semanas com IFN alfa-2b + RBV.

Interessante notar que, nesses estudos, o tratamento por 48 semanas não aumentou a chance de RVS em pacientes com genótipo 2 ou 3. Além disso, a carga viral elevada também não foi fator de má resposta nesse grupo de pacientes com genótipo favorável (McHUTCHISON et al, 1998; POYNARD et al, 1998).

Há quatro anos, Poynard et al (POYNARD et al, 2000), baseando-se em análise retrospectiva da base de dados dos 1.744 pacientes incluídos nos dois estudos multicêntricos internacionais (McHUTCHISON et al, 1998; POYNARD et al, 1998), sugeriu que pacientes com genótipo 2 ou 3 com RNA-VHC negativo por PCR na semana 24 do tratamento deveriam ser tratados por mais 24 semanas quando apresentassem menos de três fatores preditivos de boa resposta (carga viral abaixo de 3,5 milhões de cópias por mililitro, fibrose ausente ou portal, sexo feminino e idade inferior a 40 anos).

Essa estratégia, conhecida como tratamento “à la carte”, foi seguida por algum tempo no Brasil, sendo mencionada inclusive na Portaria 639 do Ministério da Saúde publicada no Diário Oficial da União em 26 de junho de 2000 (PORTARIA GM/MS 639/00, 2000). No entanto, após a publicação do estudo que sugeria o tratamento “à la carte” da hepatite crônica C (POYNARD et al, 2000), doze hepatologistas de renome internacional redigiram carta-resposta, publicada em revista médica indexada de grande impacto (MARCELLIN et al, 2000). Neste documento havia forte crítica à metodologia empregada, praticamente invalidando as conclusões do estudo de Poynard et al (POYNARD et al, 2000).

A partir da publicação dessa carta-resposta, a estratégia “à la carte” passou a ser questionada, principalmente por basear-se em análise retrospectiva de dados gerados com outros objetivos. Como consequência, a nova Portaria 863 do Ministério da Saúde, publicada no Diário Oficial da União em 08 de novembro de 2002 (PORTARIA GM/MS 863/02, 2002), concluiu que pacientes com hepatite crônica C portadores de genótipo 2 ou 3 deveriam voltar a ser tratados com IFN convencional + RBV por 24 semanas, independente de qualquer fator preditivo positivo ou negativo.

Assim, todos nossos pacientes foram tratados com IFN convencional + RBV, fornecidos pela SES/RS, seguindo as normas das Portarias 639 e 863. Cinco dos 44 pacientes usaram a estratégia “à la carte” e foram tratados por 48 semanas, sendo dois pertencentes ao grupo de 16 indivíduos com mutações HFE e três pertencentes ao grupo de 28 indivíduos sem mutações HFE.

Quanto aos grupos com e sem RVS, verificou-se que apenas um dos 11 casos com RVS havia sido tratado por 48 semanas, comparado com quatro dos 33 casos sem RVS. Como o percentual foi semelhante entre os grupos com e sem mutação HFE (13% *versus* 11%, respectivamente; $P > 0,05$), bem como entre os grupos com e sem RVS (9% *versus* 12%, respectivamente; $P > 0,05$), o tempo de tratamento parece não ter influenciado os resultados do presente estudo.

Os estudos multicêntricos internacionais usando tanto IFN alfa-2b + RBV (Rebetron®) (McHUTCHISON et al, 1998; POYNARD et al, 1998) quanto IFN peguilado + RBV (HADZYANNIS et al, 2004) também não mostraram maior RVS em pacientes com genótipo 2 ou 3 do VHC tratados por 48 *versus* 24 semanas, mesmo em indivíduos com fatores preditivos negativos importantes, tais como carga viral elevada, fibrose em ponte ou cirrose.

Contudo, permanece a dúvida em relação ao motivo do percentual de RVS ter sido muito inferior ao publicado na literatura internacional. Nesse sentido, algumas possíveis explicações, discutidas a seguir, podem ser aventadas para tentar elucidar essa discrepância.

Inicialmente, deve ser destacado que os pacientes tratados no presente estudo apresentavam ferritina elevada pré-tratamento, a qual tem sido reconhecida como fator de má resposta ao tratamento antiviral com IFN + RBV (DISTANTE et al, 2002; HOFER et al, 2004; LEBRAY et al, 2004).

Com efeito, no estudo de Distant et al (DISTANTE et al, 2002), conduzido na Noruega, 256 pacientes com hepatite crônica C, virgens de tratamento, receberam IFN alfa-2b + RBV (Rebetron®) por seis meses. Os resultados mostraram que os 127 pacientes que não atingiram a RVS apresentavam níveis significativamente mais elevados de ferritina sérica pré-tratamento em comparação com os 129 que alcançaram a RVS (130 microgramas/litro *versus* 75 microgramas/litro, respectivamente; $P < 0,001$). Interessante notar que não houve diferença nos níveis médios de saturação da transferrina pré-tratamento entre os grupos.

Da mesma maneira, no estudo de Hofer et al (HOFER et al, 2004), conduzido na Áustria, 131 pacientes com hepatite crônica C, virgens de tratamento, receberam IFN + RBV. Destes, 71 alcançaram a RVS e 60 não. Os níveis médios de ferritina sérica pré-tratamento foram significativamente menores nos pacientes com RVS em comparação com os pacientes sem RVS (137 microgramas/litro *versus* 270 microgramas/litro, respectivamente; $P < 0,01$). Interessante notar que a ferritina foi o único parâmetro de sobrecarga de ferro

associado com a RVS nesse estudo, superando a saturação da transferrina e o índice de ferro no tecido hepático.

Também no estudo de Lebray et al (LEBRAY et al, 2004), realizado na França, a ferritina elevada revelou ser fator preditivo de má resposta ao tratamento com IFN + RBV, reduzindo a razão de chance de atingir a RVS para 0,26 (intervalo de confiança de 95%: 0,09 a 0,70; $P < 0,0001$). De modo semelhante ao relatado no estudo anterior, de Hofer et al (HOFER et al, 2004), o nível sérico de ferritina pré-tratamento foi o único teste de sobrecarga de ferro associado com a RVS nesse estudo.

No presente estudo, todos os pacientes possuíam níveis elevados de ferritina sérica pré-tratamento, ajudando assim a explicar os níveis baixos de RVS aqui obtidos. Em nossa casuística, a ausência de diferença significativa na média da ferritina pré-tratamento entre os pacientes com e sem RVS, conforme já mencionado, deve-se provavelmente ao fato de todos os pacientes incluídos nesse estudo apresentarem níveis elevados de ferritina, mascarando assim a validade deste parâmetro como fator preditivo de resposta ao tratamento com IFN + RBV.

Por outro lado, deve ser mencionado que outros autores (PIANKO et al, 2002) também não encontraram relação entre ferritina sérica elevada e ausência de RVS, persistindo certa controvérsia em relação ao verdadeiro impacto deste teste na probabilidade de erradicação sustentada do RNA do VHC após o tratamento com IFN + RBV.

Outro aspecto diz respeito ao fato de que, no presente estudo, não houve padronização do tipo de IFN (alfa-2a ou alfa-2b) ou RBV utilizados, nem dos fabricantes dos mesmos. A aquisição dos produtos dependia de licitação organizada pela SES/RS. Como vários fabricantes foram licitados, não se tem

conhecimento da bioequivalência entre os medicamentos fornecidos, fato esse reconhecido por médico integrante da própria Secretaria da Saúde, em publicação recente (ALVES et al, 2003).

Nessa mesma publicação (ALVES et al, 2003), a SES/RS mostrou sua experiência no tratamento da hepatite crônica C com o IFN e RBV fornecidos por meio da Assessoria de Medicamentos Especiais.

Da mesma forma que o ocorrido em nosso estudo, os resultados encontrados foram muito inferiores aos publicados na literatura médica internacional. Por exemplo, entre os 173 pacientes com genótipos 2 e 3 tratados por 6 meses com IFN + RBV pelo protocolo da SES/RS, a RVS foi observada em apenas 69 casos (39%), contrastando com os 69% (McHUTCHISON et al, 1998) e 64% (POYNARD et al, 1998) obtidos nos estudos internacionais para pacientes com hepatite crônica C infectados pelo genótipo 2 ou 3 do VHC tratados por 24 semanas com IFN alfa-2b + RBV padronizados (Rebetron®).

Embora a diferença no percentual de RVS seja de tal magnitude que leve realmente a duvidar da qualidade do IFN e da RBV fornecidos em nosso meio, deve-se destacar que outros fatores poderiam ter contribuído para o pior resultado encontrado nos pacientes tratados pelo protocolo da SES/RS. Nesse sentido, sabe-se que a intensidade da fibrose hepática constitui fator preditivo negativo para RVS. Contudo, na experiência da SES/RS (ALVES et al, 2003), a fibrose hepática não pode ser usada para explicar os maus resultados encontrados, pois 45% dos pacientes tratados com IFN + RBV pelo protocolo da SES/RS apresentavam fibrose em ponte ou cirrose, percentual idêntico ao encontrado nos pacientes tratados no estudo multicêntrico internacional (McHUTCHISON et al, 1998).

Em contrapartida, nos 44 pacientes incluídos em nosso estudo, verificou-se cirrose em 28 e fibrose em ponte em cinco, constituindo 75% de fibrose significativa na casuística estudada. Esse resultado foi bem maior dos que os 45% de cirrose e fibrose em ponte relatados no estudo multicêntrico internacional (McHUTCHISON et al, 1998) e na experiência da SES/RS, podendo explicar, em parte, a pior resposta terapêutica encontrada no presente trabalho.

Outra razão para a pior RVS observada neste estudo poderia estar relacionada ao fato de tratamentos realizados em ambiente de pesquisa clínica apresentarem melhores resultados em comparação com os obtidos na “vida real” (PARIENTE et al, 2003). Com efeito, nos protocolos prospectivos, os critérios de inclusão costumam ser extremamente rígidos e os pacientes frequentemente recebem abordagem diferenciada.

Nesse sentido, pesquisadores italianos observaram que a taxa de erradicação do *Helicobacter pylori* foi bastante inferior em pacientes atendidos no ambulatório de hospital universitário, quando comparados àquela registrada em ensaios clínicos, mesmo usando tratamentos de primeira linha (DELLA MONICA et al, 2002).

Por outro lado, Pariente et al (PARIENTE et al, 2003), em estudo recente realizado na França, procurou comparar a RVS obtida com tratamento padronizado (IFN alfa-2b + RBV; Rebetron®) fornecido fora de estudos clínicos prospectivos, com a RVS obtida com o mesmo tratamento, porém dentro de protocolo de pesquisa (estudo multicêntrico Europeu-Canadense) publicado por Poynard et al (POYNARD et al, 1998). Foram analisados 262 pacientes com hepatite crônica C tratados durante 48 semanas em 31 centros de hepatologia franceses. Os autores observaram que os 262 pacientes tratados fora de

protocolos de pesquisa possuíam a mesma distribuição de gênero masculino/feminino e genótipo 1/não-1 do que a dos 227 pacientes tratados com IFN alfa-2b + RBV (Rebetron®) por 48 semanas no estudo multicêntrico Europeu-Canadense, porém a média de idade era maior e o percentual de indivíduos com cirrose também (17% *versus* 5%, respectivamente).

A RVS encontrada foi um pouco menor do que a publicada no estudo multicêntrico (37% *versus* 43%, respectivamente), mas a diferença não alcançou significância estatística, sugerindo que o tratamento com IFN + RBV, quando padronizado e fornecido de maneira adequada, funciona tão bem na “vida real” quanto nos estudos clínicos randomizados.

Com relação aos aspectos demográficos, verificou-se que, no presente estudo, a média de idade de 48 anos foi discretamente mais elevada do que a observada nos estudos multicêntricos internacionais, de 42 anos (POYNARD et al, 1998) e 44 anos (McHUTCHISON et al, 1998). Além disso, o gênero masculino predominou em nosso estudo (91%), contrastando com os 63% (POYNARD et al, 1998) e 65% (McHUTCHISON et al, 1998) dos estudos internacionais.

Este fato poderia ser relevante para explicar o baixo percentual de RVS, visto que Poynard et al (POYNARD et al, 2000) identificaram idade superior a 40 anos e sexo masculino como fatores preditivos de negativos para RVS. No entanto, deve ser lembrado que não houve, em nosso estudo, diferença estatística significativa nestes parâmetros quando comparados os pacientes com e sem RVS.

O valor da carga viral pré-tratamento como fator preditivo de resposta não foi avaliado no presente estudo, pois este teste não estava disponível na rede pública quando da realização do mesmo. Contudo, os estudos multicêntricos

internacionais (McHUTCHISON et al, 1998; POYNARD et al, 1998) mostraram claramente que este parâmetro não influenciou na resposta de pacientes com genótipo 2 ou 3 do VHC. Por esse motivo selecionamos apenas pacientes com esse genótipo para o presente estudo. Sabe-se que nos pacientes com genótipo 1 do VHC a carga viral influencia o percentual de RVS, tornando impossível a avaliação do efeito isolado da mutação HFE.

Assim, em nossa casuística, existem comprovadamente vários motivos para explicar os níveis baixos de RVS alcançados, porém o único dos parâmetros estudados que mostrou diferença estatisticamente significativa tanto na RVFT quanto na RVS foi a presença ou ausência da mutação HFE. De fato, os resultados mostraram ausência completa de RVS no grupo de pacientes heterozigotos para as mutações C282Y, H63D ou ambas.

Existem poucos estudos publicados (DISTANTE et al, 2002; HOFER et al, 2004; LEBRAY et al, 2004) avaliando o papel do polimorfismo HFE no percentual de RVS em pacientes com hepatite crônica C tratados com IFN + RBV.

Os resultados encontrados por esses autores diferem do presente estudo, porém a população estudada foi também muito distinta das principais características de nossa casuística, exemplificadas por exclusividade de pacientes com genótipo 2 ou 3 e ferritina elevada, com grande predominância de homens e doença bastante avançada na maioria.

Em que pese estas marcantes diferenças, os estudos conflitantes serão analisados separadamente a seguir. Distante et al (DISTANTE et al, 2002), avaliaram 256 pacientes com hepatite crônica C sem história prévia de tratamento com IFN monoterapia ou combinado com RBV. Apenas a mutação C282Y do gene HFE foi avaliada nesse estudo. Os resultados mostraram que a RVS ao

tratamento com IFN + RBV por seis meses foi significativamente maior nos 38 pacientes com a mutação C282Y (68% versus 48%; $P = 0,02$).

Outros autores (LEBRAY et al, 2004) usaram IFN + RBV em 146 pacientes com hepatite crônica C virgens de tratamento, verificando maior percentual de RVS no grupo com mutação H63D. Curiosamente, a quantidade de ferro no tecido hepático não afetou a resposta ao tratamento, porém a presença de níveis elevados de ferritina sérica foi fator preditivo negativo para RVS. Esses autores comprovaram que os pacientes com hepatite crônica C e mutação C282Y ou H63D apresentavam níveis significativamente mais elevados dos marcadores bioquímicos de sobrecarga de ferro, sem contudo acarretar perda da RVS. Deve-se salientar que os pacientes desse estudo receberam medicamentos padronizados e não apresentavam fibrose avançada, diferindo da cauística de nosso estudo, conforme mencionado anteriormente.

Por outro lado, Hofer et al (HOFER et al, 2004), ao avaliarem 140 pacientes com hepatite crônica C tratados com IFN convencional + RBV e 29 tratados com IFN peguilado + RBV. Não houve diferença na resposta ao tratamento entre os mutantes do gene HFE e os não mutantes, porém, pacientes com níveis altos de ferritina pré-tratamento também apresentaram menor percentual de RVS.

A análise conjunta dos dados mostra que ainda existem controvérsias cercando o papel das mutações HFE, tanto com relação ao seu impacto na história natural da hepatite crônica C, quanto na resposta ao tratamento com IFN + RBV.

De fato, enquanto um estudo mostrou melhor RVS em pacientes com mutação C282Y (DISTANTE et al, 2002), outro mostrou melhor RVS com a

mutação H63D (LEBRAY et al, 2004), sendo que um terceiro estudo não mostrou diferença entre os grupos com e sem RVS quanto à presença ou não do polimorfismo HFE.

É possível que, da mesma forma que ocorre na HH, a simples presença do polimorfismo HFE não seja condição suficiente para apresentar impacto negativo, necessitando de co-fatores internos (penetrância do gene) ou externos (consumo de álcool, maior atividade histológica, fibrose avançada) para sua plena manifestação.

Nossos pacientes possuíam várias características negativas para resposta terapêutica, tais como fibrose avançada, ferritina sérica elevada, idade acima de 40 anos e alta prevalência do gênero masculino. Nesse grupo de pacientes, a especificidade da mutação HFE para ausência de RVS, bem como o valor preditivo negativo, foram de 100%.

Retirando-se os 16 pacientes com mutações HFE da amostra, verifica-se que 11 (39%) dos 28 pacientes restantes alcançaram RVS. Considerando o fato de que nove (82%) dos 11 pacientes possuíam estadiamento histológico compatível com fibrose avançada (fibrose em ponte ou cirrose), a RVS torna-se semelhante à encontrada na literatura.

De fato, Marcellin et al (MARCELLIN et al, 2003), revisaram recentemente a base de dados de dois estudos multicêntricos de fase III para tratamento de pacientes com VHC e cirrose, definida pelos autores como Metavir F3 e F4. Os autores encontraram apenas 45% de RVS nos pacientes com genótipo 2 ou 3 tratados com IFN + RBV por 48 semanas. Esse resultado não difere muito dos 39% encontrados em nossa casuística, quando não incluímos os 16 com mutação HFE.

Assim, pode-se dizer que pacientes com genótipo 2 ou 3 do VHC, ferritina sérica elevada, fibrose avançada e mutação HFE parecem ser maus candidatos ao tratamento da hepatite crônica C com IFN convencional + RBV. Não foi necessário empregar análise estatística multivariada em nosso estudo, pois a única variável associada com o desfecho de ausência de RVS foi a mutação HFE.

O mecanismo pelo qual a mutação HFE poderia atrapalhar a resposta terapêutica permanece ainda obscuro. O efeito direto poderia estar relacionado ao próprio gene HFE e sua homologia com o sistema HLA, provocando distúrbio na ativação do sistema imunológico. Por outro lado, indiretamente, o polimorfismo HFE poderia aumentar a deposição de ferro no organismo, aumentando a fibrose hepática e até mesmo a replicação do VHC (EISENBACH et al, 2004).

Quanto ao possível efeito imunológico direto, sabe-se que a proteína codificada pelo gene HFE é semelhante a peptídeo do sistema HLA classe-I (FEDER et al, 1996). Ainda que não existam evidências concretas indicando que a proteína HFE compartilhe certas funções com o sistema HLA, como, por exemplo, auxiliar na apresentação de antígenos de membrana aos linfócitos T citotóxicos, parece razoável supor que possa exercer algum papel no funcionamento adequado do sistema imunológico (TEN ELSHOF et al, 1999).

Nesse sentido, sabe-se que diversos agentes infecciosos desenvolveram mecanismos para escapar da resposta imune celular, incluindo estratégias ligadas a inibição da expressão de moléculas HLA classe-I na membrana celular, removendo assim o alvo preferencial do ataque dos linfócitos T citotóxicos (LORENZO et al, 2001). Experimentos *in vitro* demonstraram que o VHC utiliza esse mecanismo (TARDIF & SIDDIQUI, 2003), o qual lhe proporciona vantagem evolutiva e potencializa a cronificação, permitindo sua sobrevivência em meio

hostil. Assim, a proteína HFE mutante, ao diminuir sua expressão na membrana celular, poderia provocar distúrbio imunológico por perda da função inerente de proteína do sistema HLA classe-I.

Por outro lado, quanto ao efeito indireto, representado pelo aumento da deposição de ferro e aumento da fibrose hepática, vários relatos têm mostrado maior fibrose em pacientes VHC positivos com mutações HFE, principalmente a C282Y (SMITH et al, 1998; MARTINELLI et al, 2000; BONKOVSKY et al, 2002; ERHARDT et al, 2003; GEHRKE et al, 2003; TUNG et al, 2003).

No estudo de Gehrke et al (GEHRKE et al, 2003) a razão de chance para fibrose significativa foi de 2,5 em heterozigotos C282Y e 4,8 em heterozigotos compostos.

Da mesma maneira, no estudo de Erhardt et al (ERHARDT et al, 2003), os autores encontraram prevalência 5,7 vezes maior de fibrose significativa entre os pacientes VHC positivos heterozigotos (simples ou compostos) para a mutação C282Y. Segundo os autores, não foi verificada diferença significativa no estágio da fibrose hepática em pacientes heterozigotos para a mutação H63D (ERHARDT et al, 2003; GEHRKE et al, 2003).

Em contrapartida, Tung et al (TUNG et al, 2003) realizaram projeções matemáticas para calcular a probabilidade de progressão da fibrose até o estágio de fibrose em ponte ou cirrose em 15 anos, encontrando razão de chance da ordem de 30 e 22 vezes maior para heterozigotos C282Y e H63D, respectivamente, em comparação com VHC positivos não mutantes.

Esses dados são recentes e baseiam-se em avaliações realizadas em grande número de pacientes. Quando analisados em conjunto, sugerem

fortemente a existência de influência deletéria das mutações do gene HFE na sobrecarga de ferro e progressão da fibrose em pacientes com hepatite crônica C.

Porém, deve ser considerado que existem inúmeras variáveis capazes de afetar a progressão da doença, tais como idade, gênero, consumo de álcool e duração da doença, entre outras. Assim, torna-se difícil elucidar o papel isolado da mutação HFE em estudos com casuística pequena.

Para elucidar definitivamente essa questão, possivelmente sejam necessários grandes estudos prospectivos com número elevado de pacientes e correção estatística adequada para todas as variáveis envolvidas (BATALLER et al, 2003).

Em nossa casuística não se encontrou maior prevalência dos marcadores de sobrecarga de ferro nos indivíduos com mutação HFE. Nosso achado encontra respaldo em outros autores que não evidenciaram relação entre polimorfismo HFE e sobrecarga de ferro hepática ou mesmo maior fibrose em pacientes com hepatite crônica C (KAZEMI-SHIRAZI et al, 1999; NEGRO et al, 2000; THORBURN et al, 2002).

Não foi utilizada metodologia para medir o índice de ferro hepático, porém a análise histológica com coloração pelo método do azul da Prússia não mostrou diferença entre os grupos. Esse aspecto não foi discutido no presente estudo pelo fato do achado de hemossiderose significativa encontrar-se ausente em praticamente todas biópsias analisadas, com exceção de dois pacientes, ambos sem mutação HFE.

Finalmente, quanto à resposta terapêutica, vale mencionar que dois dos 16 pacientes com mutação HFE já se submeteram a novo tratamento com IFN peguilado + RBV por 48 semanas, alcançando RVS. Portanto, a mutação HFE

não confere impedimento absoluto à erradicação do VHC, podendo ser superada por melhora no tratamento antiviral.

Talvez, baseado nessa experiência, fosse prudente iniciar o tratamento com IFN peguilado + RBV em casos semelhantes. No entanto, a Portaria 863 não permite o uso desse tipo de IFN em pacientes com genótipo 2 ou 3 do VHC, mesmo que apresentem fibrose avançada e outros fatores preditivos de má resposta. É possível que os resultados desse estudo possam contribuir para motivar mudanças na forma de tratar pacientes “difíceis”, mesmo que seu genótipo pareça favorável.

No entanto, sabe-se que alguns especialistas aguardam estudos prospectivos randomizados e controlados para modificar suas condutas, seguindo os preceitos recomendados pela medicina baseada em evidências (COUTINHO, 1998). Não há dúvida que essa postura pode ser adequada, no entanto, deve ser lembrado que vários procedimentos em medicina foram adotados antes de que houvesse comprovação baseada em estudos randomizados controlados.

Como exemplo, pode-se mencionar a colecistectomia videolaparoscópica, cujo emprego foi difundido mundialmente antes que houvesse estudo com metodologia recomendada pela medicina baseada em evidências que comprovasse sua vantagem sobre a colecistectomia clássica (PROCEEDINGS OF THE NIH CONSENSUS DEVELOPMENT CONFERENCE ON GALLSTONES AND LAPAROSCOPIC CHOLECYSTECTOMY, 1993).

Talvez a própria validade científica da “medicina baseada em evidências” não esteja baseada em evidências. Recentemente, Poynard et al (POYNARD et al, 2002) revisaram 474 conclusões obtidas de artigos originais e metanálises sobre cirrose e hepatite em adultos, publicados entre 1945 e 1999. Até o ano

2000, 285 das 474 conclusões (60%) ainda eram consideradas verdadeiras, 91 (19%) estavam obsoletas e 98 (21%) foram consideradas falsas.

Interessante notar que a sobrevida em 20 anos das conclusões baseadas em estudos não randomizados foi até maior do que a dos estudos randomizados, (87% versus 85%; $P > 0,05$), levando a conclusão lógica de que a sobrevida das “verdades científicas” apoiadas em estudos com melhor qualidade metodológica não foi maior do que a sobrevida de “verdades” apoiadas em pequenos estudos não randomizados e não controlados.

Esse achado mostra, de forma inequívoca, que a utilidade dos preceitos ditados pela “medicina baseada em evidências” não pode ser simplesmente aceita sem reservas, devendo antes comprovar se realmente confere benefícios à prática médica.

Devido aos altos custos dos procedimentos médicos diagnósticos e terapêuticos, multiplicam-se as normas, manuais e portarias visando padronizar as condutas e limitar os gastos em medicina. No entanto, esses instrumentos, por sua natureza em geral inflexível, falham em contemplar as infinitas variáveis que cercam as doenças e os doentes.

Espera-se que as conclusões do presente estudo provoquem maior reflexão sobre os rumos atuais da medicina. Quanto do ato médico está sendo guiado atualmente pelos paradigmas da ciência, da estatística e da “medicina baseada em evidências”, em detrimento da arte da medicina?

Neste novo milênio, quem irá garantir ao médico o direito de individualizar suas condutas, conjugando arte e ciência, para maximizar as chances de cura de seus pacientes?

6. CONCLUSÕES

- A prevalência de mutações do gene HFE foi de 36,4% em portadores do vírus C com genótipos 2 ou 3 e ferritina elevada.
- Comparando-se as características demográficas, laboratoriais e histológicas dos pacientes em relação à presença das mutações do gene HFE, encontrou-se, nos pacientes com as mutações do gene HFE, menor percentual de resposta virológica ao final do tratamento e ausência total de resposta sustentada, sendo a diferença considerada estatisticamente significativa entre os grupos.
- Não houve diferença na sobrecarga de ferro (níveis séricos de ferritina e saturação da transferrina) entre os grupos com e sem mutação do gene HFE.
- Comparando-se as características demográficas, laboratoriais e histológicas dos pacientes em relação à presença ou não de RVS, não houve diferença na sobrecarga de ferro (níveis séricos de ferritina e saturação da transferrina) entre os grupos com e sem mutação do gene HFE.
- Nesse estudo, a única variável que se mostrou associada tanto com a RVFT quanto com a RVS foi a ausência de mutações do gene HFE.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adams PC. Population screening for haemochromatosis. *Gut* 2000; 46: 301-303.
- Adams PC, Kertesz AE, McLaren CE, et al. Population screening for haemochromatosis: a comparison of unbound iron-binding capacity, transferrin saturation and C282Y genotyping in 5,211 voluntary blood donors. *Hepatology* 2000; 31: 1160-1164.
- Aguilar-Martinez P, Bismuth M, Picot MC, et al. Variable phenotypic presentation of iron overload in H63D homozygotes: are genetic modifiers the cause? *Gut* 2001; 48: 836-842.
- Alberti A, Chemello L, Benvegnú L. Natural history of hepatitis C. *J Hepatol* 1999; 31 (Suppl. 1): 17-24.
- Alves AV, Azevedo APC, Perin C, et al. Tratamento de pacientes com hepatite crônica pelo vírus C com interferon-alfa e ribavirina: a experiência da Secretaria de Saúde do Rio Grande do Sul. *Arq Gastroenterol* 2003; 40: 227-232.
- Andrews NC. Disorders of iron metabolism. *N Engl J Med* 1999; 341: 1986-1995.
- Asberg A, Hveem K, Thorstensen K, et al. Screening for hemochromatosis: high prevalence and low morbidity in an unselected population of 65,238 persons. *Scand J Gastroenterol* 2001; 36: 1108-1115.
- Bacon BR. Iron overload states. *Clin Liv Dis* 1998; 2: 63-75.
- Barbaro G, Di Lorenzo G, Ribersani M, et al. Serum ferritin and hepatic glutathione concentrations in chronic hepatitis C patients related to the hepatitis C virus genotype. *J Hepatol* 1999; 30: 774-782.

- Barton AL, Banner BF, Cable EE, Bonkovsky HL. Distribution of iron in the liver predicts the response of chronic hepatitis C infection to interferon therapy. *Am J Clin Pathol* 1995; 103: 419-24.
- Bassett ML, Halliday JW, Ferris RA, Powell LW. Diagnosis of hemochromatosis in young subjects: Predictive accuracy of biochemical screening tests. *Gastroenterology* 1984; 87: 628-633.
- Bataller R, North KE, Brenner DA. Genetic polymorphisms and the progression of liver fibrosis: a critical appraisal. *Hepatology* 2003; 37: 493–503.
- Bedossa, P. Presentation of a grid for computer analysis for compilation of histopathologic lesions in chronic viral hepatitis C. Cooperative study of the METAVIR group. *Ann Pathol* 1993; 13: 260-5.
- Bedossa P, Poynard T, for the METAVIR Cooperative Study Group. An algorithm for the grading of activity in chronic hepatitis C. *Hepatology* 1996; 24: 289–293.
- Beinker NK, Voigt MD, Arendse M, Smit J, Stander IA, Kirsch RE. Threshold effect of liver iron content on hepatic inflammation and fibrosis in hepatitis B and C. *J Hepatol* 1996; 25: 633–638.
- Bennett MJ, Lebron JA, Bjorkman PJ. Crystal structure of the hereditary haemochromatosis protein HFE complexed with transferrin receptor. *Nature* 2000; 403: 46–53.
- Beutler E, Felitti VJ, Koziol JA, Ho NJ, Gelbart T. Penetrance of 845G-A (C282Y) HFE hereditary hemochromatosis mutation in the USA. *Lancet* 2002; 359: 211-218.
- Bittencourt PL. Análise dos antígenos de HLA-A e das mutações do HFE em pacientes com Hemocromatose hereditária. *GED* 2001; 20 (suplemento 1): 95.

- Bomford A. Genetics of haemochromatosis. *Lancet* 2002; 360: 1673-1681.
- Bonkovsky HL, Banner BF, Rothman AL. Iron and chronic viral hepatitis. *Hepatology* 1997; 25: 759-768.
- Bonkovsky HL, Jawaid Q, Tortorelli K, et al. Non-alcoholic steatohepatitis and iron: increased prevalence of mutations of the HFE gene in non-alcoholic steatohepatitis. *J Hepatol* 1999; 31: 421-429.
- Bonkovsky HL, Lambrecht RW, Shan Y. Iron as a co-morbid factor in nonhemochromatotic liver disease. *Alcohol* 2003; 30: 137-144.
- Bonkovsky HL, Troy N, McNeal K, et al. Iron and HFE or TfR1 mutations as comorbid factors for development and progression of chronic hepatitis C. *J Hepatol* 2002; 37: 848-854.
- Borot N, Roth MP, Malfroy L, et al. Mutations in the MHC class I - like candidate gene for haemochromatosis in French patients. *Immunogenetics* 1997; 45: 320-324.
- Borwein S, Ghent CN, Valberg LS. Diagnostic efficacy of screening tests for hereditary hemochromatosis. *Can Med Assoc* 1984; 131: 895-901.
- Boucher E, Bourienne A, Adams P, Turlin B, Brissot P, Deugnier Y. Liver iron concentration and distribution in chronic hepatitis C before and after interferon treatment. *Gut* 1997; 41: 115-120.
- Bridle KR, Frazer DM, Wilkins SJ, et al. Disrupted hepcidin regulation in HFE-associated haemochromatosis and the liver as a regulator of body iron homeostasis. *Lancet* 2003; 361: 669-673.
- Brissot P, Moirand R, Jouanolle AM, et al. A genotypic study of 217 unrelated probands diagnosed as "genetic haemochromatosis" on "classical" phenotypic criteria. *J Hepatol* 1999; 30: 588-593.

- Britton RS, Fleming RE, Parkkila S, Waheed A, Sly WS, Bacon BR. Pathogenesis of hereditary hemochromatosis: genetics and beyond. *Semin Gastrointest Dis* 2002; 13: 68–79.
- Brock JH, Mulero V. Cellular and molecular aspects of iron and immune function. *Proc Nutr Soc* 2000; 59: 537–540.
- Burt MJ, George PM, Upton JD, et al. The significance of the haemochromatosis gene mutations in the general population: implications for screening. *Gut* 1998; 43: 830-836.
- Camma C, Di Bona D, Craxi A. The impact of antiviral treatments on the course of chronic hepatitis C: an evidence-based approach. *Curr Pharm Des* 2004; 10: 2123-2130.
- Campos AGS. Pesquisa das mutações do gene HFE em pacientes portadores de hepatite C com sobrecarga de ferro. *GED* 2001; 20 (suplemento 1): 94.
- Cassanelli S, Pignatti, Montosi G, et al. Frequency and biochemical expression of C282Y/H63D hemochromatosis (*HFE*) gene mutations in the healthy adult population in Italy. *J Hepatol* 2001; 34: 523-528.
- Cheinquer H, Coelho-Borges S, Cheinquer N, Krug L, Ashton-Prolla P. H63D and C282Y *HFE* mutations prevent sustained virologic response to interferon plus ribavirin in chronic hepatitis C patients with serum markers of iron overload. *J Hepatol* 2002 (abstract); 36 (Suppl. 1): 232.
- Chomcczynski P & Sacchi N. Single-Step method of RNA isolation by Acid Guanidinium Thiocyanate-Phenol-Chloroform extraction. *Analytical Biochemistry* 1987; 162: 156-159.
- Choo QL, Kuo G, Weiner AJ, Overby LR, Bradley DW, Houghton M. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science* 1989; 244: 359–362.

- Coelho-Borges S, Cheinquer H, Cheinquer N, Krug L, Ashton-Prolla P. Heterozygosity for hereditary hemochromatosis prevents virologic response to interferon plus ribavirin in chronic hepatitis C patients with serum markers of iron overload. *Hepatology* 2001 (abstract); 34: 607A.
- Coelho Borges S, Cheinquer H, Cheinquer N, Krug L, Ashton-Prolla P. HFE gene mutations prevent sustained virological response to interferon plus ribavirin in chronic hepatitis C patients with serum markers of iron overload. *Am J Gastroenterol* 2002 (letter); 97: 1570-1571.
- Conte D, Manachino D, Colli A, et al. Prevalence of genetic hemochromatosis in a cohort of Italian patients with diabetes mellitus. *Ann Intern Med* 1998; 128: 370-373.
- Cotler SJ, Bronner MP, Press RD, et al. End-stage liver disease without hemochromatosis associated with elevated hepatic iron index. *J Hepatol* 1998; 29: 257–262.
- Coutinho M. Como aplicar a medicina baseada em evidências (MBE) à prática clínica e ao ensino. In: Drummond JP & Silva E. *Medicina baseada em evidências. Novo Paradigma assistencial e pedagógico*. 1^a Ed. São Paulo, Atheneu, 1998. p.115-134.
- Crawford DHG, Hickman P. Screening for hemochromatosis. *Hepatology* 2000; 31: 1192-93.
- Cullen LM, Gao X, Eastal S, Jazwinska EC. The hemochromatosis 845G-A and 187C-G mutations: prevalence in non-Caucasian populations. *Am J Hum Genet* 1998; 62: 1403-1407.
- Datz C, Lalloz MR, Vogel W, et al. Predominance of the HLA-H Cys282Tyr mutation in Austrian patients with genetic haemochromatosis. *J Hepatol* 1997; 27: 773-779.

- Davis GL, Albright JE, Cook SF, Rosenberg DM. Projecting future complications of chronic hepatitis C in the United States. *Liver Transpl* 2003 9: 331-338.
- Della Monica P, Lavagna A, Masoero G, Lombardo L, Crocellá L, Pera A. Effectiveness of Helicobacter pylori eradication treatments in a primary care setting in Italy. *Aliment Pharmacol Ther* 2002; 16: 1269-1275.
- Di Bisceglie AM, Axiotis CA, Hoofnagle J, Bacon B. Measurements of iron status in patients with chronic hepatitis. *Gastroenterology* 1992; 102: 2108-2113.
- Di Bisceglie AM, Bonkovsky HL, Chopra S, et al. Iron reduction as an adjuvant to interferon therapy in patients with chronic hepatitis C who have previously not responded to interferon: A multicenter, prospective, randomized, controlled trial. *Hepatology* 2000; 32: 135-138.
- Distante S, Bjoro K, Hellum KB, et al. Raised serum ferritin predicts non-response to interferon and ribavirin treatment in patients with chronic hepatitis C infection. *Liver* 2002; 22: 269-275.
- Domingo E, Escarmis C, Sevilla N, et al. Basic concepts in RNA virus evolution. *FASEB J* 1996; 10: 859-864.
- Donahue JG, Munoz A, Ness PM, et al. The declining risk of post-transfusion hepatitis C virus infection. *N Engl J Med* 1992; 327: 369-373.
- Eaton JW, Qian M. Molecular bases of cellular iron toxicity. *Free Radic Biol Med* 2002; 32: 833-840.
- Edwards CQ, Griffen LM, Goldgar D, Drummond C, Skolnick MH, Kushner JP. Prevalence of hemochromatosis among 11,065 presumably healthy blood donors. *N Engl J Med* 1988; 318: 1355-1362.
- Eisenbach C, Gehrke SG, Stremmel W. Iron, the HFE gene, and hepatitis C. *Clin Liv Dis* 2004; 8: 775-785.

- Erhardt A, Maschner-Olberg A, Mellenthin C, et al. HFE mutations and chronic hepatitis C: H63D and C282Y heterozygosity are independent risk factors for liver fibrosis and cirrhosis. *J Hepatol* 2003; 38: 335-342.
- Fargion S, Fracanzani AL, Rossini A, et al. Iron reduction and sustained response to interferon-alpha therapy in patients with chronic hepatitis C: results of an Italian multicenter randomized study. *Am J Gastroenterol* 2002; 97: 1204–1210.
- Farinati F, Cardin R, De Maria N, et al. Iron storage, lipid peroxidation and glutathione turnover in chronic anti-HCV positive hepatitis. *J Hepatol* 1995; 22: 449–456.
- Feder JN, Gnirke A, Thomas W, et al. A novel MHC class I - like gene is mutated in patients with hereditary hemochromatosis. *Nat Genet* 1996; 13: 399-408.
- Feder JN, Tsuchihashi Z, Irrinki A, et al. The hemochromatosis founder mutation in HLA-H disrupts beta2-microglobulin interaction and cell surface expression. *J Biol Chem* 1997; 272: 14025–14028.
- Fleming RE, Britton RS, Waheed A, Sly WS, Bacon BR. Pathogenesis of hereditary hemochromatosis. *Clin Liv Dis* 2004; 18: 755-773.
- Fong TL, Han SH, Tsai NCS, et al. A pilot randomized, controlled trial of the effect of iron depletion on long-term response to alpha-interferon in patients with chronic hepatitis C. *J Hepatol* 1998; 28: 369-374.
- Fontana RJ, 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* 2000; 31: 730–736.
- Ganz T. Heparin, a key regulator of iron metabolism and mediator of anemia of inflammation. *Blood* 2003; 102: 783–788.

- Gehrke SG, Stremmel W, Mathes I, Riedel HD, Bents K, Kallinowski B. Hemochromatosis and transferrin receptor gene polymorphisms in chronic hepatitis C: impact on iron status, liver injury and HCV genotype. *J Mol Med* 2003; 81: 780–787.
- Giannini E, 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 and alpha-glutathione S-transferase levels. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2001; 13: 1355-1361.
- Girelli CM, Mirata C, Lesingo E. Iron overload and response to alpha-interferon in chronic hepatitis C. *Am J Gastroenterol* 1995; 90:170.
- Gramenzi A, Andreone P, Fiorino S, et al. Impact of interferon therapy on the natural history of hepatitis C virus related cirrhosis. *Gut* 2001; 48: 843-848.
- Guyader D, Boucher E, Andre P, et al. A pilot study of iron depletion as adjuvant therapy in chronic hepatitis C patients not responding to interferon. *Am J Gastroenterol* 1999; 94: 1696–1698.
- Guyader D, Jacquelinet C, Moirand R, et al. Non-invasive prediction of fibrosis in C282Y homozygous hemochromatosis. *Gastroenterology* 1998; 115: 929-936.
- Hadziyannis SJ, Sette H Jr, Morgan TR, et al. Peginterferon-alpha2a and ribavirin combination therapy in chronic hepatitis C: a randomized study of treatment duration and ribavirin dose. *Ann Intern Med* 2004; 140: 346-55.
- Hanson EH, Imperatore G, Burke W. *HFE* gene and hereditary hemochromatosis: a HuGE review. *Am J Epidemiol* 2001; 154: 193-206.
- Haque S, Chandra B, Gerber MA, Lok ASF. Iron overload in patients with chronic hepatitis C: A clinicopathologic study. *Hum Pathol* 1996; 27: 1277-1281.

- Hayashi H, Takikawa T, Nishimura N, et al. Improvement of serum aminotransferase levels after phlebotomy in patients with chronic active hepatitis C and excess hepatic iron. *Am J Gastroenterol* 1994; 89: 986-988.
- Heintges T, Wands JR. Hepatitis C virus: epidemiology and transmission. *Hepatology* 1997; 26: 521–526.
- Herrera JL. Iron depletion is not effective in inducing a virologic response in patients with chronic hepatitis C who failed to respond to interferon therapy. *Am J Gastroenterol* 1999; 94: 3571–3575.
- Hezode C, Cazeneuve C, Coue O, et al. Liver iron accumulation in patients with chronic active hepatitis C: Prevalence and role of hemochromatosis gene mutations and relationship with hepatic histological lesions. *J Hepatol* 1999; 31: 979-984.
- Hofer H, Osterreicher C, Jessner W, et al. Hepatic iron concentration does not predict response to standard and pegylated-IFN/ribavirin therapy in patients with chronic hepatitis C. *J Hepatol* 2004; 40: 1018-1022.
- Houglum K, Ramm GA, Crawford DHG, Witztum JL, Powell LW, Chojkier M. Excess iron induces hepatic oxidative stress and transforming growth factor β 1 in genetic hemochromatosis. *Hepatology* 1997; 26: 605-610.
- Ioannou GN, Kowdley KV. Heparin in HFE-associated hemochromatosis: another piece of the "iron" puzzle. *Gastroenterology* 2004; 126: 615-616.
- Ioannou GN, Tung BY, Kowdley KV. Iron in hepatitis C: villain or innocent bystander? *Semin Gastrointest Dis* 2002; 13: 95–108.
- Izumi N, Enomoto N, Uchihara M, et al. Hepatic iron contents and response to interferon-alpha in patients with chronic hepatitis C. Relationship to genotypes of hepatitis C virus. *Dig Dis Sci* 1996; 41: 989-994.

- Jackson HA, Carter K, Darke C, et al. HFE mutations, iron deficiency and overload in 10500 blood donors. *Br J Haematol* 2001; 114: 474-484.
- Jezequel P, Bargain M, Lellouche F, Geffroy F, Dorval I. Allele frequencies of hereditary hemochromatosis gene mutations in a local population of west Brittany. *Hum Genet* 1998; 102: 332-333.
- Jouanolle AM, Gandon G, Jezequel P, et al. Haemochromatosis and HLA-H. *Nat Genet* 1996; 14: 251-252.
- Kageyama F, Kobayashi Y, Murohisa G, et al. Failure to respond to interferon-alpha 2a therapy is associated with increased hepatic iron levels in patients with chronic hepatitis C. *Biol Trace Elem Res* 1998; 64: 185-196.
- Kakizaki S, Takagi H, Horiguchi N, et al. Iron enhances hepatitis C virus replication in cultured human hepatocytes. *Liver* 2000; 20: 125-128.
- Kasahara A, Tanaka H, Okanoue T, et al. Interferon treatment improves survival in chronic hepatitis C patients showing biochemical as well as virological responses by preventing liver-related death. *J Viral Hepat* 2004; 11: 148-156.
- Kazemi-Shirazi L, Datz C, Maier-Dobersberger T, et al. The relation of iron status and hemochromatosis gene mutations in patients with chronic hepatitis C. *Gastroenterology* 1999; 116: 127-134.
- Klainchot FH. Análise da frequência C282Y e H63D em uma amostragem de uma população brasileira. *GED* 2001; 20 (suplemento 1): 95.
- Krawczak M, Cooper DN, Schmidtke J. Estimating the efficacy and efficiency of cascade genetic screening. *Am J Hum Genet* 2001; 69: 361-370.
- Lebray P, Zylberberg H, Hue S, et al. Influence of HFE gene polymorphism on the progression and treatment of chronic hepatitis C. *J Viral Hepat* 2004; 11: 175-82.

- Lombard M, Chua E, O'Toole P. Regulation of intestinal non-haem iron absorption. *Gut* 1997; 40: 435-439.
- Lorenzo ME, Ploegh HL, Tirabassi RS. Viral immune evasion strategies and the underlying cell biology. *Semin Immunol* 2001; 13: 1–9.
- Lucotte G. Frequency analysis and allele map in favour of the Celtic origin of the C282Y mutation of hemochromatosis. *Blood Cell Mol Dis* 2001; 27: 549-556.
- Ludwig J, Hashimoto E, Porayko M, Moyer T, Baldus W. Hemosiderosis in cirrhosis: study of 447 native livers. *Gastroenterology* 1997; 112: 882-888.
- Marcellin P, Benhamou JP, Heathcote J, Bismuth H, Desmet V, Guardia J, Lok A, Buschenfeld KH, Pagliaro L, Paumgartner G, Rodes J, Sherlock S. A la carte interferon for hepatitis C? *Hepatology* 2000; 32: 678-679.
- Marcellin P, Brillanti S, Cheinquer H, et al. Peginterferon alfa-2a (40 KD) (Pegasys) plus ribavirin (Copegus) is an efficacious and safe treatment for chronic hepatitis C (CHC) in patients with compensated cirrhosis. *J Hepatology* 2003; 38 (Suppl. 2): 154
- Martell M, Esteban JI, Quer J, Genesca J, Weiner A, Esteban R, et al. Hepatitis C virus (HCV) circulates as a population of different but closely related genomes: quasispecies nature of HCV genome distribution. *J Virol*. 1992; 66: 3225–3229.
- Martinelli AL & Zago MA. Porphyria cutanea tarda in Brazilian patients: association with hemochromatosis C282Y mutation and hepatitis C virus infection. *Am J Gastroenterol* 2000; 95: 3516-21.
- Martinelli AL, Franco RF, Villanova MG, et al. Are haemochromatosis mutations related to the severity of liver disease in hepatitis C virus infection? *Acta Haematol* 2000; 102: 152-156.

- Martinelli AL, Ramalho LN, Zucoloto S. Hepatic stellate cells in hepatitis C patients: relationship with liver iron deposits and severity of liver disease. *J Gastroenterol Hepatol* 2004; 19: 91-98.
- McDonnell SM, Hover A, Gloe D, Ou CY, Cogswell ME, Grummer-Strawn L. Population-based screening for hemochromatosis using phenotypic and DNA testing among employees of health maintenance organizations in Springfield, Missouri. *Am J Med* 1999; 107: 30–37.
- McHutchison JG, Gordon SC, Schiff ER et al. Interferon alfa-2b alone or in combination with ribavirin as initial treatment for chronic hepatitis C. *N Engl J Med* 1998; 339: 1485-1489.
- McLaren CE, McLachlan GJ, Halliday JW, et al. Distribution of transferrin saturation in an Australian population: relevance to the early diagnosis of hemochromatosis. *Gastroenterology* 1998; 114: 543-549.
- McOmish F, Yap PL, Dow BC, et al. Geographical distribution of hepatitis C virus genotypes in blood donors: an international collaborative survey. *J Clin Microbiol* 1994; 32: 884-892.
- Merryweather-Clarke AT, Pointon JJ, Shearman JD, Robson KJ. Global prevalence of putative haemochromatosis mutations. *J Med Genet* 1997; 34: 275-278.
- National Institutes of Health. Consensus Development Conference Statement: Management of hepatitis C 2002. *Gastroenterology* 2002; 123: 2082-2099.
- Negro F, Samii K, Rubbia-Brandt L, et al. Hemochromatosis gene mutations in chronic hepatitis C patients with and without liver siderosis. *J Med Virol* 2000; 60: 21-27.

- Nielsen P, Carpinteiro S, Fischer R, et al. Prevalence of the C282Y and H63D mutations in the *HFE* gene in patients with hereditary haemochromatosis and in control subjects from Northern Germany. *Br J Haematol* 1998; 103: 842-845.
- Olynyk JK, Cullen DJ, Aquila S, Rossi E, Summerville L, Powell LW. A population based study of the clinical expression of the hemochromatosis gene. *N Engl J Med* 1999; 341: 718-724.
- Olynyk JK, Reddy KR, Di Bisceglie AM, et al. Hepatic iron concentration as a predictor of response to interferon alfa therapy in chronic hepatitis C. *Gastroenterology* 1995; 108: 1104-1109.
- Pariante A, Djilloul A, Cadranel JF, Association Nationale des Gastroenterologues des Hopitaux Generaux. Treatment of chronic hepatitis C with interferon alpha and ribavirin. Results in "real life". *Gastroenterol Clin Biol* 2003; 27: 590-595.
- Park CH, Valore EV, Waring AJ, Ganz T. Heparin, a urinary antimicrobial peptide synthesized in the liver. *J Biol Chem* 2001; 276: 7806–7810.
- Parkkila S, Niemela O, Britton RS, et al. Molecular aspects of iron absorption and HFE expression. *Gastroenterology* 2001; 121: 1489–1496.
- Philpott CC. Molecular aspects of iron absorption: Insights into the role of HFE in hemochromatosis. *Hepatology* 2002; 35: 993-1001.
- Pianko S, McHutchison JG, Gordon SC, et al. Hepatic iron concentration does not influence response to therapy with interferon plus ribavirin in chronic HCV infection. *J Interferon Cytokine Res* 2002; 22: 483-489.
- Pietrangelo A. Haemochromatosis. *Gut* 2003; 52 (Suppl.2): ii23–ii30.
- Pietrangelo A. Metals, oxidative stress, and hepatic fibrogenesis. *Semin Liver Dis* 1996; 16: 13–30.

- Piperno(a) A, Sampietro M, Pietrangelo A, et al. Heterogeneity of haemochromatosis in Italy. *Gastroenterology* 1998; 114: 996-1002.
- Piperno(b) A, Vergani A, Malosio I, et al. Hepatic iron overload in patients with chronic viral hepatitis: role of HFE gene mutations. *Hepatology* 1998; 28: 1105–1109.
- Portaria GM/MS nº 639/00. Diretrizes terapêuticas para hepatite viral crônica tipo C. *DOU* nº 121-E, de 26-06-00.
- Portaria GM/MS nº 863/02. Protocolo clínico e diretrizes terapêuticas - hepatite viral crônica C. *DOU* nº 217-I, de 08-11-02.
- Powell LW, Subramaniam VN, Yapp TR. Haemochromatosis in the new millennium. *J Hepatol* 2000; 32 (Suppl.1): 48–62.
- Poynard T, Marcellin P, Lee SS, et al. Randomized trial of interferon alfa-2b plus ribavirin for 48 weeks or for 24 weeks *versus* interferon alfa-2b plus placebo for 48 weeks for treatment of chronic infection with hepatitis C virus. *Lancet* 1998; 352: 1426-1430.
- Poynard T, McHutchison J, Goodman Z, Ling MH, Albrecht J. Is an "a la carte" combination interferon alfa-2b plus ribavirin regimen possible for the first line treatment in patients with chronic hepatitis C? The ALGOVIRC Project Group. *Hepatology* 2000; 31: 211-218.
- Poynard T, Moussalli J, Ratziu V, Regimbeau C, Opolon P. Effect of interferon therapy on the natural history of hepatitis C virus-related cirrhosis and hepatocellular carcinoma. *Clin Liver Dis* 1999; 3: 869-881.
- Poynard T; Munteanu M; Ratziu V; Benhamou Y; Di Martino V; Taieb J; Opolon P. Truth Survival in Clinical Research: An Evidence-Based Requiem? *Ann Intern Med* 2002; 136: 888-895.

- Proceedings of the NIH Consensus Development Conference on Gallstones and Laparoscopic Cholecystectomy. Bethesda, Maryland, September 14-16, 1992. *Am J Surg* 1993; 165: 387-548.
- Ramm GA, Crawford DH, Powell LW, et al. Hepatic stellate cell activation in genetic haemochromatosis: Lobular distribution, effect of increasing hepatic iron and response to phlebotomy. *J Hepatol* 1997; 26: 584-592.
- Roudot-Thoraval F, Bastie A, Pawlotsky JM et al. Epidemiological factors affecting the severity of hepatitis C virus-related liver disease: A french survey of 6,664 patients. The Study Group for the Prevalence and Epidemiology of Hepatitis C Virus. *Hepatology* 1997; 26: 485-491.
- Ryan E, O'Keane C, Crowe J. Haemochromatosis in Ireland and HFE. *Blood Cells Mol Dis* 1998; 24: 428-432.
- Sampietro M, Piperno A, Lupica L, et al. High prevalence of the His63Asp HFE mutation in Italian patients with porphyria cutanea tarda. *Hepatology* 1998; 27: 181–184.
- Sanguinetti CJ, Dias Neto E, Simpson AJG. Rapid Silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels. *BioTechniques* 1994; 17: 915-919.
- Sartori M, Andorno S, Rigamonti C, Boldorini R. Chronic hepatitis C treated with phlebotomy alone: Biochemical and histological outcome. *Dig Liver Dis* 2001; 33: 157-162.
- Scheuer PJ. Classification of chronic viral hepatitis: a need for reassessment. *J Hepatol* 1991; 13: 372–374.
- Smith BC, Gorge J, Guzail MA, et al. Heterozygosity for hereditary hemochromatosis is associated with more fibrosis in chronic hepatitis C. *Hepatology* 1998; 27: 1695–1699.

- Steinberg KK, Cogswell ME, Chang JC, et al. Prevalence of C282Y and H63D mutations in the hemochromatosis (*HFE*) gene in the United States. *JAMA* 2001; 285: 2216-2222.
- Strader DB, Wright T, Thomas DL, Seeff LB. Diagnosis, management, and treatment of hepatitis C. *Hepatology* 2004; 39: 1147-1171.
- Stuart KA, Busfield F, Jazwinska EC, et al. The C282Y mutation in the haemochromatosis gene (*HFE*) and hepatitis C virus infection are independent cofactors for porphyria cutanea tarda in Australian patients. *J Hepatol* 1998; 28: 404-409.
- Tanaka H, Tsukuma H, Kasahara A, et al. Effect of interferon therapy on the incidence of hepatocellular carcinoma and mortality of patients with chronic hepatitis C: a retrospective cohort study of 738 patients. *Int J Cancer* 2000; 87: 741-749.
- Tardif KD, Siddiqui A. Cell surface expression of major histocompatibility complex class I molecules is reduced in hepatitis C virus subgenomic replicon-expressing cells. *J Virol* 2003; 77: 11644–11650.
- Tavill AS. Diagnosis and management of hemochromatosis. *Hepatology* 2001; 33: 1321–1328.
- Taylor MR, Gatenby PB. Iron absorption in relation to transferrin saturation and other factors. *Br J Haematol* 1966; 12: 747-753.
- Ten Elshof AE, Brittenham GM, Chorney KA, et al. Gamma delta intraepithelial lymphocytes drive tumor necrosis factor-alpha responsiveness to intestinal iron challenge: relevance to hemochromatosis. *Immunol Rev* 1999; 167: 223–232.
- Terra C. Estudo piloto da prevalência e significado prognóstico da mutação da hemocromatose hereditária em portadores de hepatopatia pelo VHC. *GED* 2001; 20 (suplemento 1): 94-95.

- The METAVIR Cooperative Group. Inter- and intra-observer variation in the assessment of liver biopsy of chronic hepatitis C. *Hepatology* 1994; 20: 15–20.
- The UK Haemochromatosis Consortium. A simple genetic test identifies 90% of UK patients with haemochromatosis. *Gut* 1997; 41: 841-844.
- Thorburn D, Curry G, Spooner R, et al. The role of iron and haemochromatosis gene mutations in the progression of liver disease in chronic hepatitis C. *Gut* 2002; 50: 248–252.
- Townsend A, Drakesmith H. Role of HFE in iron metabolism, hereditary haemochromatosis, anemia of chronic liver disease, and secondary iron overload. *Lancet* 2002; 359: 786-790.
- Trinder D, Fox C, Vautier G, Olynyk JK. Molecular pathogenesis of iron overload. *Gut* 2002; 51: 290–295.
- Tsai NCS, Zuckerman E, Han SH, et al. Effect of iron depletion on long-term response to interferon- α in patients with chronic hepatitis C who previously did not respond to interferon therapy. *Am J Gastroenterol* 1997; 92:1831-1834.
- Tung BY, Emond MJ, Bronner MP, Raaka SD, Cotler SJ, Kowdley KV. Hepatitis C, iron status, and disease severity: relationship with HFE mutations. *Gastroenterology* 2003; 124: 318–326.
- Van Thiel DH, Friedlander L, Faggioli S, et al. Response to interferon α therapy is influenced by the iron content of the liver. *J Hepatol* 1994; 20: 410-415.
- Van Thiel DH, Friedlander L, Molloy PJ, et al. Retreatment of hepatitis C interferon non-responders with larger doses of interferon with and without phlebotomy. *Hepatogastroenterology* 1996; 43: 1557–1561.

Veldt BJ, Saracco G, Boyer N, et al. Long term clinical outcome of chronic hepatitis C patients with sustained virological response to interferon monotherapy. *Gut* 2004; 53: 1504-1508.

Waheed A, Parkkila S, Zhou XY, et al. Hereditary haemochromatosis: effects of the C282Y and H63D mutations on association with β 2-microglobulin, intracellular processing, and cell surface expression of the HFE protein in COS-7 cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 12384-12389.

Weiss G, Umlauf F, Urbanek M, et al. Associations between cellular immune effector function, iron metabolism, and disease activity in patients with chronic hepatitis C virus infection. *J Infect Dis* 1999; 180: 1452-1458.

Weiss G. Iron and immunity: a double-edged sword. *Eur J Clin Invest* 2002; 32(Suppl 1): 70–78.

Willis G, Wimperis JZ, Lonsdale R, et al. Incidence of liver disease in people with HFE mutations. *Gut* 2000; 46: 401-404.

ANEXO A

Nº	Idade	Sexo	ALT (UI/l)	Gen	Fibrose	HFE	C282Y	H63D	FER (ng/dl)	SAT (%)	RVFT	RVS
1	46	M	396	3	4	N	N	N	1.838	25	S	S
2	53	M	350	3	4	N	N	N	1.200	67	S	S
3	46	M	257	3	2	N	N	N	1.349	47	N	N
4	55	M	175	3	4	S	N	S	1.000	45	S	N
5	40	M	504	3	4	N	N	N	2.599	68	S	S
6	55	M	193	2	4	S	N	S	1.735	58	N	N
7	46	M	231	3	4	S	S	S	1.145	70	N	N
8	59	M	326	3	4	S	N	S	1.192	71	N	N
9	49	M	405	3	4	S	S	N	2.865	83	N	N
10	51	M	254	3	4	S	N	S	607	42	N	N
11	31	M	154	3	1	N	N	N	804	30	S	N
12	44	M	215	3	4	N	N	N	810	54	S	S
13	43	M	279	3	4	N	N	N	1.020	25	N	N
14	42	M	516	3	4	N	N	N	1.581	59	S	S
15	50	M	188	3	4	N	N	N	1.233	46	N	N
16	38	M	205	3	4	S	N	S	1.000	60	N	N
17	46	M	495	3	4	N	N	N	617	53	S	N
18	49	M	138	3	4	N	N	N	1.167	75	N	N
19	44	M	71	3	3	N	N	N	1.200	25	S	S
20	61	M	92	3	4	N	N	N	500	ND	S	N
21	49	F	218	3	1	N	N	N	823	39	S	N
22	50	F	123	3	4	N	N	N	500	ND	N	N
23	50	F	226	2	4	N	N	N	778	64	S	S
24	52	M	369	2	4	S	N	S	946	47	S	N
25	50	M	150	3	4	S	S	S	500	25	N	N
26	63	M	102	3	4	N	N	N	920	ND	S	S
27	49	M	147	3	3	S	N	S	1.380	75	N	N
28	44	M	353	3	3	N	N	N	1.050	ND	S	N
29	53	M	97	3	0	N	N	N	914	26	N	N
30	53	M	215	3	1	S	N	S	1.280	46	N	N
31	42	M	230	3	4	N	N	N	1.902	75	N	N
32	48	M	241	3	3	N	N	N	614	48	S	N
33	58	M	91	2	4	N	N	N	514	35	S	S
34	57	M	55	2	1	N	N	N	611	ND	N	N
35	63	M	90	2	1	N	N	N	800	35	S	S
36	56	F	153	3	1	S	S	S	722	ND	N	N
37	26	M	120	3	0	N	N	N	500	45	S	S
38	39	M	120	3	4	S	N	S	846	ND	S	N
39	42	M	119	3	3	S	S	N	1.845	86	S	N
40	47	M	178	3	1	S	N	S	655	40	N	N
41	57	M	300	3	1	S	N	S	1.011	56	N	N
42	47	M	364	3	4	N	N	N	2.147	43	S	N
43	42	M	257	3	4	N	N	N	1.000	ND	N	N
44	43	M	340	3	4	N	N	N	542	29	N	N

ARTIGO

**HFE GENE MUTATIONS PREVENT SUSTAINED VIROLOGIC RESPONSE
TO INTERFERON PLUS RIBAVIRIN IN CHRONIC HEPATITIS C PATIENTS
WITH SERUM MARKERS OF IRON OVERLOAD**

Silvia Coelho-Borges

Hugo Cheinquer

Nelson Cheinquer

Luciano Krug

Patrícia Ashton-Prolla

Gastroenterology Service of the Hospital das Clínicas de Porto Alegre
Universidade Federal do Rio Grande do Sul School of Medicine and Amplicon
Laboratory. Porto Alegre, RS, Brazil

Silvia Coelho Borges

Rua Hilário Ribeiro 202/502

CEP 90510-040 Porto Alegre, RS, Brazil

silvia@cb.terra.com.br

TO THE EDITOR: Abnormal serum iron studies are found in approximately 50% of the patients with chronic hepatitis C (1). Hepatic iron concentration (HIC) is increased in a small proportion of these patients, but not to the degree of iron loading seen in hereditary hemochromatosis (2,3). Numerous studies have shown that HIC has an effect in the response rate to interferon monotherapy in patients with chronic HCV infection (4-7). To the best of our knowledge, an association between H63D/C282Y HFE mutations and the efficacy of interferon plus ribavirin (IFN/RBV) treatment of chronic hepatitis C patients has not been previously demonstrated, except for an abstract recently published by our group with preliminary data on 21 patients (8).

We report now 34 patients with chronic hepatitis C and ferritin levels above 500 ng/mL who were treated with IFN/RBV in a single center. Our protocol was designed to include only treatment-naïve HCV infected patients (anti-HCV ELISA-3 and PCR positive) with elevated ALT and compensated liver disease who have received at least 80% of prescribed IFN alfa (3 million units 3 times a week) plus RBV (1,000 mg daily) for at least 80% of the intended duration.

Patients were tested for HCV-RNA six months after the initiation of treatment using an "in-house" PCR with a lower limit of detection of 200 copies/mL. Therapy was discontinued in those with a positive result and they were classified as virologic non-responders (VNR). Patients with a negative HCV-RNA received six additional months of IFN/RBV. At the end of the twelve-month treatment period HCV-RNA was tested again: those with a positive result were considered VNR and those with a negative result were

considered end of treatment virologic responders (EOTVR). Patients with a negative HCV-RNA were followed for six months after the end of treatment and HCV-RNA was tested once more: those with a negative result were defined as sustained virologic responders (SVR) and those with a positive result as virologic relapsers. HFE mutation analysis was done prospectively using PCR amplification followed by restriction-enzyme digestion with *RsaI* (for C282Y mutation analysis) and *BclI* (for H63D mutation analysis) as previously published (9). Histologic analysis was performed by an experienced pathologist unaware of the HFE mutation status.

HFE mutations were found in 14/34 patients (41%), with the following genotypes: 10/14 (72%) H63D heterozygotes; 2/14 (14%) C282Y heterozygotes, and 2/14 (14%) C282Y/H63D compound heterozygotes. There were no significant differences between patients with and without HFE mutations except for the SVR rate (Table 1). The absence of SVR to standard IFN/RBV treatment in chronic hepatitis C patients with serum markers of iron overload and HFE gene mutations is a preliminary finding that will require confirmation in future prospective studies with a larger sample size.

Table 1. Demographics and clinical characteristics of HFE non-mutants vs. HFE mutants.

Variable	HFE non- mutants (n=20)	HFE mutants (n=14)	<i>p</i> Value
Mean age (years) ± SD	48.7 ± 5.6	48.4 ± 4.1	0.8
Male sex	15/20 (75%)	14/14 (100%)	0.06
Fibrosis Stage			
Transition to cirrhosis	05/20 (25%)	01/14 (7%)	0.1
Cirrhosis	12/20 (60%)	11/14 (79%)	0.2
Mean Ferritin (ng/mL) ± SD	1323.3 ± 757.2	1303.3 ± 561.4	0.8
Mean Transferrin saturation ± SD	50.8% ± 15.2%	52.4% ± 17.2%	0.9
Mean ALT (UI/L) ± SD	307.5 ± 149.1	284 ± 87.2	0.7
HCV Genotype			
Genotype 1	07/20 (35%)	06/14 (43%)	0.2
Genotype 2,3	13/20 (65%)	08/14 (57%)	0.2
Virologic Response to IFN/RBV*			
End of treatment response	11/20 (55%)	04/14 (29%)	0.1
Sustained response	06/20 (30%)	0/14 (0%)	0.03

Abbreviations: HFE, hereditary hemochromatosis gene; SD, standard deviation of mean; ALT, alanine aminotransferase; HCV, hepatitis C virus; IFN/RBV, interferon plus ribavirin treatment. *Negative HCV-RNA by PCR (lower limit of detection of 200 copies/mL).

REFERENCES

1. Di Bisceglie AM, Axiotis CA, Hoofnagle JH, et al. Measurement of iron status in patients with chronic hepatitis. *Gastroenterology* 1992;102:2108-2113.
2. Bacon BR. Iron overload states. *Clin Liv Dis* 1998;2:63-75.
3. Bacon BR. Hemochromatosis: Diagnosis and management. *Gastroenterology* 2001; 120: 718-725.
4. Van Thiel DH, Friedlander L, Fagioli S, et al. Response to interferon therapy is influenced by the iron content of the liver. *J Hepatol* 1994; 20:410-415.
5. Olynyk JK, Reddy KR, Di Bisceglie AM, et al. Hepatic iron concentration as a predictor of response to interferon therapy in chronic hepatitis C. *Gastroenterology* 1995; 108:1104-1109.
6. Piperno A, Sampietro M, D'Alba R, et al. Iron stores, response to interferon therapy, and effects of iron depletion in chronic hepatitis C. *Liver* 1996; 16:248-254.
7. Fargion S, Fracanzani AL, Sampietro M, et al. Liver iron influences the response to interferon therapy in chronic hepatitis C. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1997; 9:497-503.
8. Coelho-Borges S, Cheinquer H, Cheinquer N, et al. Heterozygosity for hereditary hemochromatosis prevents virologic response to interferon plus ribavirin in chronic hepatitis C patients with serum markers of iron overload [Abstract]. *Hepatology* 2001;34:607A.
9. Feder JN, Gnirke A, Thomas W, et al. A novel MHC class I-like gene is mutated in patients with hereditary haemochromatosis. *Nat Genet* 1996;13:399-408.