

# GENÓTIPOS DO VHC

## Histopatologia hepática e perfil imunológico em quatro grupos de doentes

ARMANDO DE CARVALHO, ANTÓNIO MARTINHO, JORGE LEITÃO, MARIA AUGUSTA CIPRIANO, HENRIQUETA COIMBRA, ARMANDO PORTO

Serviço de Medicina III. Centro de Histocompatibilidade do Centro. Serviço de Anatomia Patológica. Faculdade de Medicina e Hospitais da Universidade de Coimbra. Coimbra.

### RESUMO

**Objectivos:** Estudo da prevalência dos genótipos do VHC e da sua correlação com a histopatologia hepática e o perfil imunológico humoral e celular dos doentes. **Doentes e métodos:** 77 doentes com hepatite crónica C (52 H, 25 M), com idade de  $44 \pm 14$  anos, divididos em quatro grupos: I. 23 (11 H) sem outra etiologia, II. 19 (18 H) bebedores excessivos, III. 18 (12 H) hemodialisados e IV. 17 (11 H) transplantados renais. Genotipagem por PCR (primers do core) e hibridização com sondas específicas (1a, 1b, 2a, 2b e 3a). Em 45 doentes foram quantificadas as Igs A, G e M (nefelometria) e procedeu-se à fenotipagem dos linfócitos do sangue periférico por citometria de fluxo (CD19, CD2, CD4, CD8). Estudo histopatológico em 69 doentes. **Resultados:** Identificou-se um único genótipo em 62 doentes e 4 tinham infecção múltipla (1b+3a num, 1b+2a em dois e 1a+3a noutro). Em 12 (15,6%) não foi possível determinar o genótipo (ND). No total, encontrou-se o 1b em 45 casos (69,2%), o 1a em 15 (21,5%), o 2a em 2 (3,1%), o 2b em 2 e o 3a em 6 (9,2%). A prevalência relativa dos genótipos não foi significativamente diferente nos 4 grupos; em 7 toxicodependentes não se encontrou o 1b, o 1a infectava 5 (71,4%) e o 3a 2 (28,6%). Nos 34 doentes com menos de 40 anos encontrou-se o 1b em 38,2%, o 1a em 29,4%, os outros em 11,8%, e os ND em 20,6%; nos 32 que tinham entre 40 e 60 anos o 1b em 68,8%, o 1a em 9,4%, os outros em 6,3% e os ND em 15,6%; nos 11 com mais de 59 anos o 1b infectava 90,9% e o 1a 9,1%. Dos identificados, só o genótipo 1 (1a ou 1b) se associava à actividade moderada e grave e infectava 11/13 casos de cirrose ou fibrose grave. As IgM tinham valores séricos mais baixos nos infectados pelo genótipo 1b do que nos outros ( $1.58 \pm 1.23$  g/dL vs.  $2.53 \pm 1.93$  g/dL,  $p < 0,01$ ) e os linfócitos eram menos numerosos ( $n/mm^3$ ), com destaque para os CD8+ ( $540 \pm 239$  vs.  $739 \pm 420$ ,  $p < 0,01$ ). **Conclusões:** O genótipo 1b é o mais prevalente nos nossos doentes, sobretudo nos mais idosos. A distribuição dos genótipos foi semelhante nos quatro grupos de doentes, mas o 1b não infectava nenhum dos toxicodependentes. Nas lesões hepáticas mais graves encontrou-se mais frequentemente o genótipo 1 (1b e 1a). A IgM e os CD8+ apresentavam valores médios mais baixos nos doentes infectados pelo genótipo 1b. A grande percentagem de casos não identificados alerta para a existência doutros genótipos em Portugal.

### SUMMARY

#### MCV Genotypes, Hepatic histopathology and immunological profile in four groups of patients

**Aim:** Study on the prevalence of MCV genotypes, and correlation with liver pathology and immunological parameters. **Patients and methods:** 77 chronic hepatitis C patients (52 males, 25 females), mean age  $44 \pm 14$  years, belonging to four groups: (I) 23 (11 males) without other aetiology, (II) 19 (18 males) excessive drinkers, (III) 18 (12 males) haemodialysed, (IV) 17 (11 males) renal transplantation patients. Genotyping was done by PCR (primers of the core), and hybridisation with specific probes. Serum Igs A, G, and M (by nephelometry), and peripheral blood lymphocyte (PBL) subsets (by flow cytometry) were determined. **Results:** One genotype was found in 62 patients (1b

69.2%, 1a 21.5%, 2a 3.1%, 2b 3.1%, 3a 9.2%), and two genotypes in 4 patients (1b+3a in 1 of group I, 1b+2a in 2 and 1a+3a in 1 of group III). Twelve cases (15.6%) were not identified (NI). Relative prevalence was not different in the four groups, but in 7 drug addicts 1b was not found (1a in 71.4%, 3a 28.6%). The relationship between genotypes and age was significant ( $p < 0.05$ ): in the 34 patients with less than 40 years, 1b was found in 38.2%, in the others in 41.2%, and NI in 20.6%; in those with 40-60 years, 1b was found in 68.8%, in the others in 15.6%, NI in 15.6%; in those above 60 years, 1b was found in 90.9%, in the others in 9.1%. Of those identified, only genotype I (1a and 1b) was associated to moderate or severe activity, and infected 11/13 cases of cirrhosis or severe fibrosis. IgM (g/dL) was lower in 1b than in the others:  $1.58 \pm 1.23$  vs.  $2.53 \pm 1.93$  ( $p < 0.01$ ). PBL (per mm<sup>3</sup>) were lesser in 1b than in the others, with significance for the CD8+:  $540 \pm 239$  vs.  $739 \pm 420$  ( $p < 0.01$ ). Conclusions: Genotype 1b was the most prevalent in Portuguese patients, more significantly in the elderly, and was absent in drug addicts. The prevalence of genotypes is similar in general patients, in chronic haemodialysed, in renal transplantation recipients and in alcoholics. More severe liver pathology was associated with 1b and 1a genotypes. IgM and CD8+ had lower mean values in 1b infected patients. Other genotypes are certainly important in Portugal.

## INTRODUÇÃO

O VHC, identificado em 1989<sup>1</sup>, é um vírus ARN, de cadeia simples, com 30-60 nm de diâmetro, capsulado, com um genoma de cerca de 9400 nucleótidos, possui uma única região de leitura (*ORF*), de sentido positivo e codifica uma longa poliproteína, com cerca de 3010 a 3033 aminoácidos<sup>2,3</sup>. Os genes da terminação 5' codificam a proteína da nucleocápside (*C*, *core*), de estrutura bastante conservada entre os diversos genótipos e duas proteínas do revestimento, variáveis, as glicoproteínas E1 e E2/NS1, esta última compreendendo a região hipervariável (HVR). Existem mais quatro regiões (NS2, NS3, NS4 e NS5) que codificam proteínas não estruturais, com funções enzimáticas<sup>4,5</sup>. A hipervariabilidade do VHC deve-se às frequentes mutações do genoma, por erros de *transcrição*<sup>6,7</sup>. A grande heterogeneidade da população viral infectante resulta na existência no mesmo indivíduo dum genoma principal (*master*) e dum conjunto doutros, semelhantes, nisso consistindo a natureza de *quasispécies* da infecção<sup>8</sup>.

Os vírus podem classificar-se pelas suas propriedades (fenótipo), pela sequência do genoma (genótipo), ou pela antigenicidade (serótipo). A dificuldade em cultivar o VHC *in vitro* torna impossível utilizar os métodos clássicos da virologia para a sua classificação filogenética, pelo que as suas variantes têm sido classificadas através da comparação das sequências de nucleótidos de diferentes regiões do genoma, designadamente a 5' não codificante (5'NCR), a NS4, a NS5 e o *core*. A genotipagem pode realizar-se por sequenciação do genoma, ou pela amplificação e detecção de sequências definidas, que se sabe corresponderem aos diferentes genótipos identificados. Para isso, utilizam-se técnicas baseadas na PCR, usando primers específicos do tipo a procurar e sondas específicas para detecção dos produtos da PCR<sup>9-11</sup>. Também se

pode determinar o serótipo, por meio de técnicas imunoenzimáticas (ELISA), empregando peptídeos sintéticos (correspondentes às regiões NS4 e do *core*), ou proteínas recombinadas (região NS4), para a detecção de anticorpos dirigidos contra epitópos dessas regiões<sup>12</sup>. Conhecem-se seis genótipos, com diversos subtipos, apresentando diferenças da sequência genómica inferiores a 10% dentro de cada tipo e superiores a 20% entre os diferentes<sup>5,13,15</sup>. Actualmente utiliza-se a classificação proposta por Simmonds, em que os genótipos são designados por algarismos e os subtipos por letras minúsculas, atribuídos por ordem da sua descoberta<sup>16</sup>.

Os genótipos 1a, 1b, 2a e 2b têm uma distribuição quase universal, com algumas variações regionais. Nos EUA, Europa Ocidental e Canadá encontram-se os genótipos 1a, 1b, 2a, 2b e 3a, com predomínio do 1b (50 a 70% dos doentes) no sul e no leste europeus<sup>17,18</sup> e do 1a nos EUA<sup>19</sup>. Diversos estudos revelaram o predomínio do genótipo 4a no Egipto e em diversos países do médio oriente e da África central<sup>14,20</sup>, do 5a na África do Sul<sup>21</sup>, do 1b no Japão, onde foi identificado pela primeira vez<sup>22</sup>, do 3 em Singapura e na Tailândia e do 6a em Hong-Kong e Macau<sup>14</sup>. A prevalência dos genótipos é também dependente da idade dos doentes, sendo o genótipo 3a mais frequente nos jovens e o 1b nos indivíduos com mais de 50 anos<sup>18</sup>. Além disso, são possíveis infecções múltiplas, em que um indivíduo é infectado por mais do que um genótipo<sup>23,24</sup>.

A variabilidade genómica pode ter implicações na patogenicidade e na gravidade da doença, na resposta ao tratamento com interferão e na obtenção de vacinas eficazes<sup>5,25,26</sup>. Inicialmente, sugeriu-se um potencial patogénico maior para o tipo 1b, por se encontrar mais frequentemente nos doentes crónicos<sup>27,28</sup> e associado a viremias mais elevadas<sup>29</sup>. Contudo, também os outros têm sido implicados em casos de doença hepática crónica

grave. A resposta à terapêutica com interferão parece ser menor nos infectados pelo genótipo 1b<sup>27-32</sup> e nos casos de infecção múltipla<sup>33</sup>. No entanto, outros atribuíram esse facto à maior viremia, que poderia estar dependente da capacidade replicativa dos diferentes genótipos<sup>34-37</sup>.

Com o objectivo de conhecer a prevalência dos genótipos mais importantes do VHC em diferentes grupos de doentes portugueses (comuns, alcoólicos, hemodialisados e transplantados renais) e de determinar a sua relação com dados clínicos e fisiopatológicos procedemos à genotipagem em casos seleccionados. Os primeiros dados obtidos foram incluídos num estudo de âmbito mais vasto sobre hepatite crónica C<sup>38</sup>, publicando-se agora os resultados finais do estudo dos genótipos do VHC.

## MATERIAL E MÉTODOS

Foram estudados 77 doentes (52 H, 25 M), com média de idades de  $44,0 \pm 14,2$  anos (17-73), todos com anti-VHC positivo (ELISA2). ARN-VHC em circulação (RT-PCR, *Amplicor-HCV, Roche Diagnostic Systems*) e hepatite crónica ou cirrose hepática, com confirmação histológica em 67 casos. Do total de doentes, 23 (11 H) não eram portadores de outra patologia nem apresentavam outra etiologia para a doença hepática (grupo I), 19 (18 H) referiam consumo alcoólico excessivo (superior a 80 g/d no homem, ou a 60 g/d na mulher), ao longo de mais de cinco anos, mas com abstinência actual (grupo II), 18 (12 H) eram insuficientes renais crónicos submetidos a hemodiálise periódica (grupo III) e 17 (11 H) eram transplantados renais (grupo IV). Sete doentes (3 do grupo I e 4 do grupo II) referiam consumo de drogas por via endovenosa.

A genotipagem foi realizada por meio da amplificação do genoma, por nested-PCR, utilizando *primers* da região do *core*<sup>39,40</sup> e hibridização dos produtos da PCR com sondas específicas, marcadas com digoxigenina, com detecção por quimioluminescência, segundo o esquema da *Figura 1*.

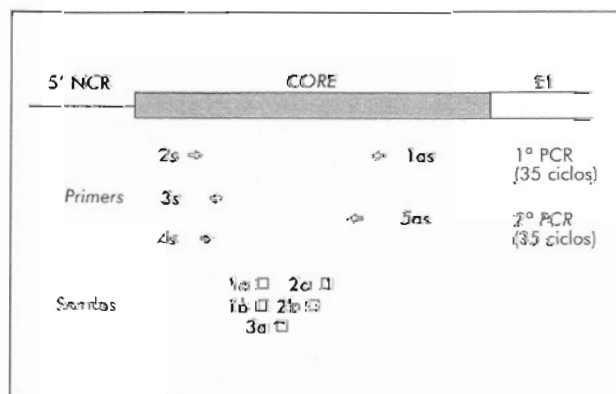


Fig. 1 - Esquema da determinação dos genótipos do VHC

Na amplificação do genoma do VHC utilizaram-se os primers anti-sense (as) e sense (s), da região do *core* (*BIOTECH*), sendo  $Y = [CTT]$ ,  $R = [ATG]$ : 1as - 5' ATG TAC CCC ATG AGG TCG GC 3'; 2s - 5' TAG ATT GGG TGT GCG CGC GA 3'; 3s - 5' CGC GCG ACT AGG AAG ACT TC 3'; 4s - 5' TGT GTG CGC GAC GCG TAA A 3'; 5as - 5' GCA YGT RAG GGT ATC GAT GAC YT 3'. Na primeira amplificação utilizaram-se os primers 1as e 2s e na segunda os outros. Cada amplificação consistiu em 35 ciclos de 1 minuto a 94° C, 1 minuto a 55° C e 1 minuto a 72° C.

A detecção dos produtos da PCR foi feita em gel de agarose a 1,5 %, procedendo-se à sua fixação em filtros de nylon (com carga positiva) e, sobre estes, à hibridização da região amplificada do VHC com sondas específicas dos genótipos, marcadas com digoxigenina (DIG-11-ddUTP, *Boehringer-Mannheim*): 1a - GCA ACC TCG AGG TAG ACG TC; 1b - GCA ACC TGC TGG AAG GCG AC; 2a - GAG GTT CCC GTC CCT CTT GG; 2b - CYC TGT AYG GAA ACG AGG GY ( $Y=[CTT]$ ); 3a - GCG CGT CGG AGC GAA GGC CG; 13s - ACC CTC GTT TCC GTA CAG AG. Os filtros foram lavados, para remoção das sondas ligadas inespecificamente, com SSPE em SDS a 0,1% (6 lavagens, à temperatura de desibridização (Td) de cada sonda).

A detecção do produto híbrido, com consequente identificação do genótipo do VHC, foi feita de acordo com o protocolo da *Boehringer-Mannheim*, utilizando anticorpos anti-digoxigenina, com fosfatase alcalina conjugada e um derivado do dióxetano (CDP-Star tm, *Boehringer-Mannheim*) como substrato quimioluminescente. Após marcação do filtro procedeu-se à autoradiografia.

O estudo histopatológico foi realizado em 67 doentes (todos os dos grupos I, II e III e 7 do grupo IV), biopsiados por punção intercostal, com agulha de Menghini (1.4 ou 1.6). Os fragmentos de parênquima hepático foram fixados imediatamente em formol tamponado, a 10 % e incluídos em parafina. Em cortes de 4 µ de espessura utilizaram-se as colorações de hematoxilina-eosina, do tricrómico de Masson e de Perl. As alterações morfológicas foram observadas e classificadas de acordo com as propostas recentes de Scheuer<sup>41</sup> e de Desmet et al.<sup>42</sup>. A actividade necro-inflamatória foi assim classificada em quatro graus, de acordo com a pontuação resultante da soma dos três primeiros componentes do índice de actividade histológica de Knodell<sup>43</sup>: mínima (0-3 pontos), ligeira (4 a 8), moderada (9 a 12) e grave (13 a 18); o estadiamento foi obtido através da magnitude da fibrose, classificada em cinco graus (0 a 4): (0) ausente, (1) ligeira (expansão fibrosa dos espaços porta, sem

pontes), (2) moderada (septo(s) porto-portal(is), com preservação da arquitectura hepática), (3) grave (septos fibrosos porto-terminais, ou com distorção da arquitectura) e (4) cirrose.

Estudaram-se alguns parâmetros imunológicos em 45 doentes, 23 infectados pelo genótipo 1b e 22 pelos outros (8 casos com genótipo não identificado). As imunoglobulinas A, G e M e as fracções C3 e C4 do complemento foram doseadas, no soro, por nefelometria (valores normais: 0,9 a 4,5 g/L para a IgA, 8 a 18 g/L para a IgG e 0,6 a 3,5 g/L para a IgM; 0,7 a 1,7 g/L para a fracção C3 e 0,15 a 0,45 g/L para a C4). A fenotipagem das populações linfocitárias do sangue periférico foi efectuada por citometria de fluxo, num citómetro EPICS-XL (Coulter Immunology). Determinaram-se os linfócitos B (CD19+) e T (CD2+) e, dentre estes, os T auxiliares (CD4+) e os T supressores/citotóxicos (CD8+), utilizando-se os anticorpos monoclonais murinos, duplos, conjugados, *Cyto-Stat/Coulter Clone T11-RD1/B4-FITC* (CD2/CD19) e *Cyto-Stat/Coulter Clone T4-RD1/T8-FITC* (CD4/CD8) (Coulter Immunology). Em cada determinação foi usado um controlo negativo e os valores de referência, para adultos, foram (linfócitos/mm<sup>3</sup> e %): 2820 ± 795 (100 %) para os linfócitos totais, 282 ± 84 (10 ± 3 %) para os CD19±, 2425 ± 169 (86 ± 6 %) para os CD2±, 1579 ± 169 (56 ± 6 %) para os CD4±, 902 ± 113 (32 ± 4 %) para os CD8± e 1,79 ± 0,28 para a relação CD4/CD8.

## RESULTADOS

Os genótipos do VHC foram identificados em 65 doentes, não se conseguindo amplificação do genoma, com os primers utilizados, em 12 casos (15,6%). Estava presente um único genótipo em 62 doentes e em 4 (6,2%) havia infecção múltipla, por dois genótipos.

Nos 65 doentes em que foi possível a identificação, o genótipo mais frequente foi o 1b, presente em 45 casos (69,2%), seguindo-se o 1a em 15 (21,5%). Os restantes eram raros: o 2a existia em 2 casos (3,1%), em ambos associado ao 1b, o 2b era o único presente noutros dois e o 3a infectava seis doentes (9,2%), em associação ao 1b num caso e ao 1a noutro. Dos quatro doentes com infecção múltipla, uma pertencia ao grupo I e estava infectada pelos genótipos 1b e 3a e os outros três eram hemodialisados e apresentavam co-infecção pelos genótipos 1b e 2a (dois homens) e 1a e 3a (uma mulher).

No Quadro I mostra-se a distribuição dos genótipos nos quatro grupos de doentes, considerando-se a totalidade dos casos, incluindo aqueles em que não foi conseguida a identificação. Salienta-se o predomínio do tipo 1, sobretudo do genótipo 1b, em todos os grupos e a ausência de diferenças

Quadro I - Genótipos do VHC nos quatro grupos de doentes

	Gr. I <sup>a</sup> n (%)	Gr. II n (%)	Gr. III <sup>#</sup> n (%)	Gr. IV n (%)	Total n (%)
1a	5 (21,7)	4 (21,1)	3 (16,7)	2 (11,8)	14 (18,2)
1b	10 (43,5)	10 (52,6)	13 (72,2)	12 (70,5)	45 (58,4)
2a	0	0	2 (11,1)	0	2 (26,0)
2b	1 (4,3)	1 (5,3)	0	0	2 (26,0)
3a	1 (4,3)	2 (10,5)	1 (5,6)	2 (11,8)	6 (7,8)
ND	7 (30,4)	2 (10,5)	2 (11,1)	1 (5,9)	12 (15,6)

<sup>a</sup> um doente com associação dos genótipos 1b e 3a

<sup>#</sup> dois doentes com associação dos genótipos 1b e 2a e um com 1a e 3a

significativas da prevalência dos vários genótipos nos quatro grupos estudados, embora com maior percentagem do 1b nos hemodialisados e nos transplantados renais.

Considerando os sete doentes com passado de toxicod dependência, verificámos que cinco (71,4%) estavam infectados pelo genótipo 1a e dois (28,6%) pelo 3a. Quatro deles referiam ingestão alcoólica excessiva, incluindo os dois infectados com o genótipo 3a.

Nos doentes do sexo masculino (n=52) encontrou-se o genótipo 1a em 11 (21,2%), o 1b em 30 (57,7%), o 2a em dois (3,8%), o 2b também em dois e o 3a num (1,9%); nos do sexo feminino (n=25) o 1a estava presente em três (12%), o 1b em 15 (60%) e o 3a em cinco (20%). Não se identificou o genótipo em oito homens (15,4%) e em quatro mulheres (16%). As diferenças são difíceis de valorizar, devido ao pequeno número de casos com infecção pelos genótipos 2 e 3.

Relativamente à idade verificou-se que nos infectados pelo 1b a média era mais elevada (48,1 ± 14,2 anos) do que naqueles em que foi identificado outro genótipo (38,4 ± 10,8 anos), sendo a diferença estatisticamente significativa (p<0,001). Na Figura 2 mostra-se a prevalência relativa em

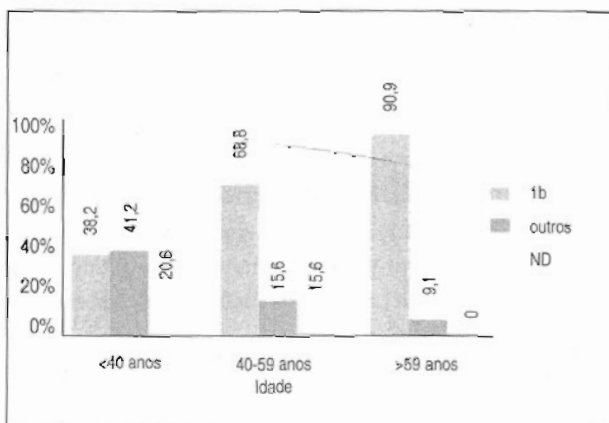


Fig. 2 - Prevalência relativa dos genótipos do VHC em 77 doentes (incluindo 12 em que não foi possível identificar o genótipo)

três grupos etários: nos doentes com menos de 40 anos (n=34), 13 estavam infectados com o genótipo 1b (38,2%), dez com o 1a (29,4%), quatro com outros (11,8%) e em sete casos não foi determinado o genótipo (20,6%); nos doentes com idade entre os 40 e os 60 anos (n=32), os números eram 22 para o 1b (68,8%), três para o 1a (9,4%), dois para os outros (6,2%) e cinco para os não identificados (15,6%); nos doentes com mais de 59 anos (n=11), dez estavam infectados pelo 1b (90,9%) e um pelo 1a (9,1%).

Nos casos em que foi identificado o genótipo, o predomínio muito marcado do 1 (1a e 1b em 90,8% dos casos) tornou difícil a comparação com os outros (2 e 3), que apenas eram responsáveis, isoladamente, pela infecção de seis casos (9,2%). Optámos por estabelecer comparações entre os infectados pelo genótipo 1b, os infectados pelos outros identificados (1a, 2a, 2b e 3a) e os doentes em quem não se determinou o genótipo infectante, procurando detectar diferenças entre o genótipo 1b e os outros.

Nas Figuras 3 e 4 resumem-se as relações dos vários genótipos com a actividade necro-inflamatória e com a fibrose.

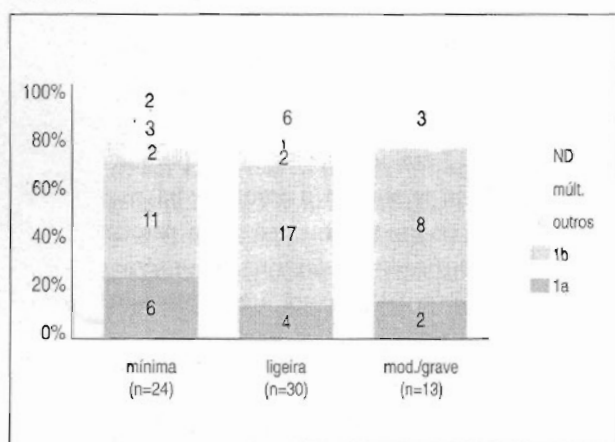


Fig. 3 - Prevalência relativa dos genótipos em três grupos de actividade necro-inflamatória

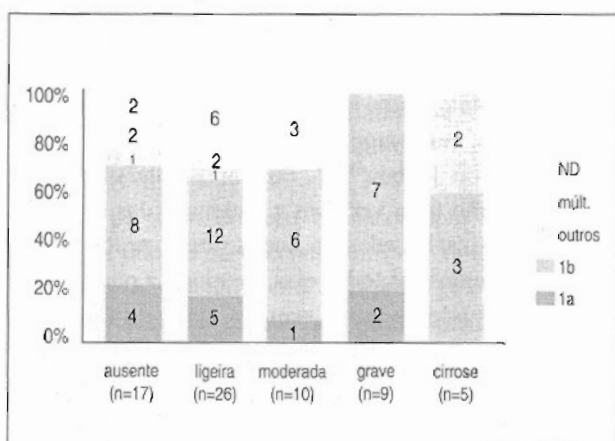


Fig. 4 - Prevalência relativa dos genótipos em cinco estádios de acordo com a magnitude da fibrose hepática

Verificou-se que, dos genótipos identificados, apenas o 1 (1a e 1b) se associava a actividade necro-inflamatória moderada ou grave (dez casos), mas havia outros três doentes infectados por genótipos não determinados. No que diz respeito ao estágio da hepatite, os genótipos 1a e 1b causavam 12 dos 14 casos de cirrose ou fibrose grave. Os restantes dois casos de cirrose ocorriam em doentes infectados pelo genótipo 3a, ambos toxicodependentes e alcoólicos, apresentando actividade necro-inflamatória pouco intensa (mínima num, ligeira noutro).

Apesar do pequeno número de casos, notava-se que os dois doentes infectados pelo genótipo 2b tinham lesões hepáticas pouco importantes: um com actividade e fibrose ligeiras e o outro com actividade mínima, sem fibrose. Comparando o genótipo 1a com o 1b, não parecia existir uma apreciável diferença no que concerne à lesão hepática, embora fosse aparente uma tendência para maior gravidade nos doentes infectados com o genótipo 1b. Contudo, o dado mais importante a realçar nesta série é que qualquer genótipo se associava a lesão hepática grave e que mesmo o 1b, referido geralmente como mais agressivo, infectava doentes com lesões menos graves.

Relativamente aos parâmetros imunológicos, na imunidade humoral (Quadro II) apenas as imunoglobulinas M tinham um valor médio mais baixo nos infectados pelo genótipo 1b: 1,58 ± 1,23 g/L no 1b versus 2,53 ± 1,93 g/L nos outros (p < 0,01). No entanto, a dispersão dos valores faz com que este achado deva ser considerado com cautela, sobretudo no que respeita a extrapolações individuais. As IgG (15,37 ± 4,29 g/L versus 15,90 ± 5,10 g/L) e IgA (3,11 ± 1,47 g/L versus 2,73 ± 1,21 g/L) não mostravam diferenças significativas. A fracção C3 do complemento apresentava um valor médio mais elevado nos doentes infectados pelo genótipo 1b (1,03 ± 0,25 g/L) do que nos outros (0,97 ± 0,10 g/L) e nos ND (0,97 ± 0,11 g/L), mas sem atingir diferença significativa. As médias da fracção C4 eram semelhantes.

Quadro II - Imunoglobulinas e complemento séricos versus genótipos do VHC

	Genótipo 1b	Outros	ND
IgG (g/L)	15,37 ± 4,29	15,90 ± 5,10	12,61 ± 1,65
IgA (g/L)	3,11 ± 1,47	2,73 ± 1,21	2,49 ± 1,57
IgM (g/L)*	1,58 ± 1,23	2,53 ± 1,93	1,81 ± 2,33
C3 (g/L)	1,03 ± 0,25	0,97 ± 0,10	0,97 ± 0,11
C4 (g/L)	0,21 ± 0,07	0,21 ± 0,09	0,24 ± 0,12

\* p < 0,01 entre 1b e outros

2

No Quadro III mostram-se os valores encontrados para as populações linfocitárias do sangue periférico, verificando-se alguns aspectos interessantes. Os linfócitos totais eram menos numerosos nos doentes infectados pelo genótipo 1b do que nos outros e nos ND, embora sem atingir significado estatístico. Os linfócitos CD19+ apresentavam médias idênticas nos grupos. Os linfócitos CD2+ tinham um valor médio mais baixo nos infectados pelo genótipo 1b, mas sem atingir significado estatístico. Dentre estes, estavam diminuídos os CD8+ ( $540 \pm 239$  linfócitos/mm<sup>3</sup> no 1b vs.  $739 \pm 420$  nos outros vs.  $818 \pm 501$  nos ND) de modo significativo ( $p < 0,05$ ), enquanto não havia diferença relativamente aos CD4+. Também não eram significativas as diferenças respeitantes às percentagens, nem à relação CD4+/CD8+.

Quadro III - Populações linfocitárias do sangue periférico versus genótipos do VHC (valor absoluto e percentagem)

		Genótipo 1b	Outros	ND
Linfócitos	n	1976 ± 741	2260 ± 721	2788 ± 1327
CD19+	n	225 ± 217	224 ± 118	306 ± 273
	%	9,6 ± 7,3	9,7 ± 5,8	10,5 ± 5,7
CD2+	n	1625 ± 588	1863 ± 625	2204 ± 1110
	%	82,2 ± 6,9	82,0 ± 5,0	79,5 ± 11,0
CD4+	n	900 ± 372	919 ± 285	1110 ± 555
	%	45,3 ± 9,3	41,8 ± 6,5	41,0 ± 10,6
CD8+	n*	540 ± 239	739 ± 420	818 ± 501
	%	28,3 ± 10,1	31,4 ± 11,3	28,9 ± 8,9
CD4/CD8		1,82 ± 0,71	1,57 ± 0,76	1,54 ± 0,59

\*  $p < 0,05$  entre 1b e outros

## DISCUSSÃO

Dos 77 doentes em quem foi tentada a genotipagem, só foi possível identificar o genótipo infectante em 65 casos. Os 12 doentes (15,6%) em quem não foi determinado tinham ARN-VHC em circulação, mas não houve amplificação com os primers utilizados. Nenhum método de genotipagem consegue identificar todos os casos<sup>44</sup>, apontando-se várias causas para essas falhas, designadamente ausência de amplificação por presença doutro(s) genótipo(s), não reconhecidos pelos primers, ou viremia muito baixa. Isto é mais frequente com métodos baseados na PCR, com primers específicos, em que a percentagem de amostras em que não se identifica o genótipo é habitualmente de 11 a 17%<sup>44-46</sup>.

Não devemos eliminar a hipótese destes casos corresponderem a infecções por outros genótipos. Julgamos

mesmo que ela é a mais provável, pois a ausência de amplificação do genoma não pode explicar-se pela viremia, uma vez que ela era suficientemente elevada para ter sido detectada não só pela RT-PCR, mas também pelo bDNA. Recentemente pudemos comprovar a existência de infecção pelo genótipo 4 numa doente nossa incluída num protocolo terapêutico internacional. Em dois outros estudos portugueses foi encontrada uma percentagem significativa de doentes infectados pelo genótipo 2c<sup>47,48</sup>. Assim, defendemos que é muito provável que haja entre nós um número considerável de casos com infecção por outros genótipos, sendo certa esse o caso de alguns (todos?) dos nossos doentes em que a identificação não foi feita.

Relativamente aos dados doutros países europeus<sup>17,18</sup>, os nossos resultados podem considerar-se concordantes. Nos 65 doentes em que se identificou o genótipo, encontramos o 1a, o 1b, o 2a, o 2b e o 3a, com um predomínio marcado do 1b (69,2% dos casos identificados), seguido do 1a (21,5%), pelo que os outros só se encontravam em cerca de 12% dos doentes, mas algumas vezes em associação aos mais frequentes.

Em relação a dados recentes dos EUA<sup>44,45,49</sup> e de França e Itália<sup>46</sup>, em que o tipo 1 (1a e 1b) era responsável por cerca de 70 % dos casos, a nossa prevalência deste genótipo é maior (90,7%), talvez porque os nossos doentes tenham adquirido a infecção há mais tempo. Contudo, não devemos esquecer que a percentagem de casos não identificados é maior na nossa série e a serem considerados no total, baixará a percentagem de casos com infecção pelos genótipos 1a e 1b.

Os outros estudos portugueses, utilizando diversas metodologias, mostraram a preponderância dos genótipos 1b e 1a, seguidos a alguma distância pelo 2<sup>48,50-54</sup>. O genótipo 2c foi encontrado apenas nas duas séries já referidas, ambas de Lisboa<sup>47,48</sup>. O genótipo 3a, que encontramos sobretudo em doentes jovens e toxicodependentes, à semelhança do que tem sido descrito, foi muito frequente numa série de Lisboa<sup>47</sup> e noutra do Porto<sup>51</sup>, mas, curiosamente, não foi encontrado noutras duas séries de Lisboa<sup>48,53</sup>. Pensamos que estas diferenças poderão ter a ver com a dimensão das amostras, mas será aconselhável uma análise mais profunda dos doentes incluídos em todas elas, de modo a poderem ser tiradas conclusões seguras acerca da epidemiologia da infecção em Portugal.

Apenas estudámos indivíduos com infecção comprovada pelo VHC e hepatite crónica, à semelhança da maioria dos trabalhos publicados. Deste modo, avaliamos a parte mais grave do espectro da infecção pelo VHC, pois não

incluímos indivíduos com sinais de infecção, mas sem doença aparente. Logo, a predominância dos genótipos habitualmente considerados mais agressivos (1a e 1b) pode estar inflacionada por este facto. No entanto, noutros estudos em que se incluíram indivíduos com aminotransferases normais, os resultados não foram unânimes: enquanto em Itália se verificou uma prevalência maior do genótipo 2a nos casos com ALT normal ou com doença menos grave<sup>55</sup>, no Japão não se encontraram diferenças da prevalência dos genótipos entre casos com e sem alterações bioquímicas<sup>56</sup>. Assim, continua a justificar-se que se alarguem os estudos aos doentes com aminotransferases normais, de modo a ter uma noção mais precisa da prevalência relativa dos diferentes genótipos e da sua relação com a actividade e a gravidade da doença. Além disso, seria muito interessante proceder à genotipagem em doentes com hepatite aguda C e procurar determinar possíveis diferenças de evolução entre os vários genótipos infectantes.

Encontrámos infecção múltipla em quatro doentes. Na realidade, a natureza de *quasispecies* da infecção pelo VHC faz com que existam genomas diferentes no mesmo indivíduo, só se identificando o dominante. Por outro lado, a identificação de mais que um genótipo, mais frequente nos métodos baseados na PCR, pode significar apenas falta de especificidade dos *primers*<sup>44</sup>. Teremos de ter essa reserva na interpretação dos nossos dados, apesar deles não se afastarem muito doutros<sup>46</sup>.

Não havia diferenças significativas entre os grupos estudados, sendo equivalente a prevalência dos diversos genótipos nos doentes comuns, nos bebedores excessivos, nos hemodialisados e nos transplantados renais, embora com uma percentagem maior de infecções pelo genótipo 1b nestes dois últimos. Ao contrário do que esperávamos, devido ao maior risco de re-infecções, não encontrámos uma percentagem maior de infecções múltiplas nos hemodialisados e transplantados.

Um grupo francês demonstrou recentemente que o genótipo 1b mostrava um declínio da prevalência nos doentes que iniciaram hemodiálise há menos tempo (16/24 antes de 1977, 14 em 24 entre 1978 e 1985, 5/12 a partir de 1985), surgindo após 1982 os genótipos 3a e 4a<sup>57</sup>. O pequeno número de casos com infecção por genótipos não-1b que encontrámos e a variabilidade dos tempos de hemodiálise nos infectados pelo 1b, não nos permitem qualquer conclusão a esse respeito. Contudo, o facto do reservatório na hemodiálise ser muito grande (cerca de 50% dos doentes estavam infectados pelo VHC), predominar largamente o genótipo 1b e ser a infecção nosocomial a mais frequente nestes casos<sup>38</sup>, fazem com que, entre nós, este genótipo seja ainda o prin-

cipal responsável pelas infecções recentes neste grupo.

Realçamos a ocorrência do genótipo 1b em idades mais avançadas e a sua ausência nos toxicodependentes (todos eles relativamente jovens). Estes dados são semelhantes aos de Noursbaum et al.<sup>46</sup>, que também encontraram mais frequentemente o genótipo 1b em doentes mais velhos (47,4 % abaixo dos 40 anos, 68,6 % entre os 40 e os 60, 80,4 % acima dos 60 anos) e menos frequentemente em toxicodependentes (30,4 %), tal como outros verificaram em Itália<sup>58</sup>. Estes autores atribuíam as diferenças à antiguidade do contágio, defendendo que o genótipo 1b seria agora menos frequente do que no passado. Contudo, num estudo americano a idade média dos infectados pelo genótipo 1b não era mais elevada, sendo a sua prevalência igualmente menor em toxicodependentes<sup>45</sup>. Provavelmente a melhor relação dos genótipos é a estabelecida com a antiguidade da infecção e não com a idade, mas esse é um dado difícil de avaliar, pois na prática não é possível determinar com rigor, na maioria dos doentes, a data do contágio.

É ainda polémica a relação entre os genótipos e o potencial patogénico do vírus, embora o 1b tenha sido relacionado com doença mais grave<sup>27,28</sup> e, recentemente, se tenha descrito a associação do genótipo 2 à maior actividade inflamatória hepática<sup>44,45</sup>. Alguns defendem que o 1b se associa a casos mais graves apenas porque essas são infecções com mais tempo de evolução, de acordo com o actual declínio deste genótipo<sup>57</sup>, parecendo-nos ser essa a interpretação mais razoável dos dados actualmente disponíveis.

Na nossa série, dada a enorme predominância do genótipo 1b, não era fácil estudar este aspecto. Contudo, verificámos que, dos identificados, só o tipo 1 (1a ou 1b) se associava a inflamação moderada e grave e que a fibrose grave e a cirrose também eram causadas por estes dois genótipos, à excepção de dois casos associados ao 3a. Este último achado é importante, pois ilustra a natureza multifactorial e individualizada das doenças hepáticas. Aqueles dois casos de infecção pelo genótipo 3a ocorreram em toxicodependentes jovens, que consumiam álcool imoderadamente e sofriam de cirrose. Ainda é cedo para conclusões definitivas, mas de um ponto de vista prático, mesmo que se prove a maior patogenicidade de certos genótipos, devemos ter presente que qualquer dos outros pode também causar doença grave, tal como demonstrámos. Assim, não se pode utilizar a genotipagem como factor de prognóstico, desinserido de todo o contexto de cada doente.

Por não encontrarmos referências ao assunto, procurámos relacionar os genótipos com parâmetros imunológi-

cos e verificámos que, quer as imunoglobulinas M, quer os linfócitos CD8+ mostravam valores mais baixos nos infectados pelo genótipo 1b. Curiosamente, essas alterações eram o inverso do que encontramos quando se comparam os parâmetros imunológicos com a actividade necro-inflamatória, no que respeita aos valores da IgM e dos linfócitos CD8+ (mais elevados nos mais graves), sendo, contudo, semelhante ao observado nos casos com fibrose mais grave, em que os valores dos CD8+ eram também mais baixos<sup>38</sup>. Uma interpretação simplista seria a de que aquelas alterações imunológicas fossem consequência do compromisso funcional hepático, associado à fibrose, que poderia ser mais grave na infecção pelo genótipo 1b. Nos nossos doentes, de 14 com fibrose grave ou cirrose, dez estavam infectados pelo genótipo 1b, o mesmo acontecendo com 26 dos outros 53. Apesar de tudo, esta diferença não era estatisticamente significativa. Outra hipótese seria o genótipo 1b ser mais agressivo por induzir menor resposta imunológica do hospedeiro, o que os nossos dados referentes aos parâmetros imunológicos do sangue periférico favorecem. Também a idade avançada se relaciona com diminuição do número de linfócitos circulantes, pelo que poderia ser uma explicação para este achado.

Haverá diferentes respostas aos vários genótipos? Estará isso na base de possíveis diferenças patogénicas? Será que uma resposta imunológica menor perante o genótipo 1b, lhe permitirá replicar-se e permanecer no organismo com maior facilidade, causando uma lesão hepática de maior gravidade, por acção citopática directa? São necessários estudos mais vastos e profundos que possam esclarecer estas e outras questões, que se prendem com a fisiopatologia e a gravidade da lesão hepática e, talvez mesmo, com a génese de alterações autoimunes associadas à hepatite C.

Em conclusão, nos nossos doentes os genótipos 1b e 1a são responsáveis pela grande maioria das hepatites crónicas C, mas não é possível estabelecer uma correlação significativa com a gravidade da doença, apesar de ser aparente uma maior gravidade histológica nos infectados pelo genótipo 1b. Os outros genótipos procurados (2a, 2b e 3a) foram encontrados mais raramente e num número considerável de doentes não se identificou o genótipo, pelo que é de supor que outros estejam implicados. Não verificámos diferenças significativas entre os grupos estudados (doentes comuns, alcoólicos, hemodialisados e transplantados renais), quanto à prevalência relativa dos genótipos. Confirmámos a maior prevalência do genótipo 1b nos indivíduos mais velhos e a sua raridade entre os toxicodependentes. Finalmente, encontramos

valores mais baixos de IgM e CD8+ nos infectados pelo genótipo 1b do que nos outros doentes, alteração que merece ser mais profundamente estudada.

## BIBLIOGRAFIA

1. CHOO Q-L, KUO G, WEINER AJ et al: Isolation of cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science* 1989; 244: 359-362.
2. HOUGHTON M, WEINER A, HAN J, KUO G, CHOO Q-L: Molecular biology of the hepatitis C viruses: implications for diagnosis, development and control of viral disease. *Hepatology* 1991; 14: 381-388.
3. ALTER HJ: Descartes before the horse: I clone, therefore I am: the hepatitis C virus in current perspective. *Ann Intern Med* 1991; 115: 644-9.
4. WEINER AJ, GEYSEN HM, CHRISTOPHERSON C et al: Evidence for immune selection of hepatitis C virus (HCV) putative envelope glycoprotein variants: potential role in chronic HCV infections. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 3468-72.
5. BRÉCHOT C, KREMSDORF D: Genetic variation of the HCV genome: random events or a clinically relevant issue? *J Hepatology* 1993; 17: 265-8.
6. HIGASHI Y, KAKUMU S, YOSHIOKA K et al: Dynamics of genome change in the E2/NS1 region of hepatitis C virus in vivo. *Virology* 1993; 197: 659-68.
7. KUMAR U, BROWN J, MONJARDINO J, THOMAS HC: Sequence variation in the large envelope glycoprotein (E2/NS1) of hepatitis C virus during chronic infection. *J Infect Dis* 1993; 167: 726-30.
8. MARTELL LM, ESTEBAN JI, QUER J 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.
9. OKAMOTO H, KOJIMA M, OKADA S-I et al. (1992-A): Genetic drift hepatitis C virus during a 8.2-year infection in a chimpanzee: variability and stability. *Virology* 1992; 190: 894-899.
10. McOMISH F, CHAN S-W, DOW BC, GILLON Y et al: Detection of three types of hepatitis C virus in blood donors: investigation of type-specific differences in serologic reactivity and rate of ALT abnormalities. *Transfusion* 1993; 33: 7-13.
11. STUYVER L, ROSSAU R, WYSEUR A, DUHAMEL M et al: Typing of hepatitis C virus isolates and characterisation of new subtypes using a lyme probe assay. *J Gen Virol* 1993; 74: 1093-102.
12. SIMMONDS P, ROSE KA, GRAHAM S, CHAN SW et al: Mapping of serotype-specific, immunodominant epitopes in the NS-4 region of hepatitis C virus (HCV): use of type-specific peptides to serologically differentiate infections with HCV types 1, 2, and 3. *J Clin Microbiol* 1993; 31: 1493-503.
13. CHA T-A, BEALL E, IRVINE B et al: At least five related, but distinct, hepatitis C viral genotypes exist. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 7144-8.
14. SIMMONDS P, HOLMES EC, CHA T-A et al. (1993-A): Classification of hepatitis C virus into six major genotypes and a series of subtypes by phylogenetic analysis of the NS-5 region. *J Gen Virol* 1993; 74: 2391-9.
15. BUKH J, MILLER RH, PURCELL RH: Genetic heterogeneity of hepatitis C virus: quasispecies and genotypes. *Sem Liv Dis* 1995; 15 (1): 41-63.
16. SIMMONDS P, ALBERTI A, ALTER HJ, BONINO F, BRADLEY DW, BRÉCHOT C et al: A proposed system for the nomenclature of hepatitis C viral genotypes. *Hepatology* 1994; 19: 1321-4.
17. DUSHEIKO G, SCHMILOVITZ-WEISS H, BROWN D, McOMISH F et al: Hepatitis C virus genotypes: an investigation of type-specific differences in geographic origin and disease. *Hepatology* 1994; 19: 13-8.
18. ZEIN NN, RAKELA J, KRAWITT EL, REDDY R et al: Hepatitis

- C virus genotypes in the United States: epidemiology, pathogenicity, and response to interferon therapy. *Ann Intern Med* 1996; 125: 634-9.
20. McOMISHI F, YAP PL, DOW BC, FOLLETT EAC et al: Geographical distribution of different hepatitis C virus genotypes in blood donors: an international collaborative survey. *J Clin Microbiol* 1994; 32: 884-92.
  21. OHNO T, MIZOKAMI M, TIBBS CJ, OHBA K et al: New genotype of hepatitis C virus in South-Africa. *J Med Virol* 1994; 42: 409-13.
  22. KATO N, HIJIKATA M, OOTSUYAMA Y et al: Molecular cloning of hepatitis C virus genome from Japanese patients with non-A, non-B hepatitis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 9524-8.
  23. KREMSDORF D, PORCHON C, KIM JP, REYES GR, BRÉCHOT C: Partial nucleotide sequence analysis of a French hepatitis C virus: implications for HCV genetic variability in the E2/NS1 protein. *J Gen Virol* 1991; 72: 2557-61.
  24. TAKAMIZAWA A, MORI C, FUKU I, MANABE S et al: Structure and organisation of the hepatitis C virus genome isolated from human carriers. *J Virol* 1991; 65: 1105-13.
  25. BRÉCHOT C: Hepatitis C virus genetic variability: clinical implications. *Am J Gastroenterol* 1994; 89: S41-S47.
  26. HONDA M, KANEKO S, SAKAI A, UNOURA M, MURAKAMI S, KOBAYASHI K: Degree of diversity of hepatitis C virus quasi-species and progression of liver disease. *Hepatology* 1994; 20: 1144-51.
  27. NOUSBAUM JB, POL S, GIGON M et al: Evidence for take over of HCV type II on type I among patients with cirrhosis with and without hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 1993; 18 (suppl. 1): S17 (abstract).
  28. POZZATO G, MORETTI M, FRANZIN F et al: The presence of "Japanese type" of NS4 region is associated to more severe liver disease. *J Hepatol* 1992; 16: S3.
  29. YOSHIOKA K, KAKUMU S, WAKITA T et al: Detection of hepatitis C virus by polymerase chain reaction and response to interferon-alpha therapy: relationship to genotypes of hepatitis C virus. *Hepatology* 1992; 16: 293-299.
  30. POZZATO G, MORETTI M, FRANZIN F, et al. - Evidence of different outcome of interferon therapy in patients infected by different HCV strains. *J Hepatol*, 1993; 18 (suppl. 1): S52.
  31. CHEMELLO L, ALBERTI A, ROSE K, SIMMONDS P - Hepatitis C serotype and response to interferon therapy. *N Engl J Med* 1994; 330: 143.
  32. TAKADA N, TAKASE S, ENOMOTO N, TAKADA A, DATE T: Clinical backgrounds of the patients having different types of hepatitis C virus genomes. *J Hepatol* 1992; 14: 35-40.
  33. OKADA S-I, AKAHANE Y, SUZUKI H et al: The degree of variability in the amino terminal region of the E2/NS1 protein of the hepatitis C virus correlates with responsiveness to interferon therapy in viremic patients. *Hepatology* 1992; 16: 619-24.
  34. LAU JYN, DAVIS GL, KNIFFEN J, QIAN K-P et al: Significance of serum hepatitis C virus RNA levels in chronic hepatitis C. *Lancet* 1993; 341: 1501-04.
  35. KOBAYASHI Y, WATANABE S, KONISHI M, YOKOI M et al: Quantitation and typing of serum hepatitis C virus RNA in patients with chronic hepatitis C treated with interferon-beta. *Hepatology* 1993; 18: 1319-25.
  36. TSUBOTA A, CHAYAMA K, IKEDA K, YASUJI A et al: Factors predictive of response to interferon-alpha therapy in hepatitis C virus infection. *Hepatology* 1994; 19: 1088-94.
  18. SIMMONDS P: Variability of hepatitis C virus. *Hepatology* 1995; 21: 570-83.
  37. YAMADA N, TANIHARA K, MIZOKAMI M et al: Full-length sequence of the genome of hepatitis C virus type 3a: comparative study with different genotypes. *J Gen Virol* 1994; 75: 3279-84.
  38. CARVALHO A: Hepatite crónica C: epidemiologia, clínica e fisiopatologia. Tese de Doutoramento, Coimbra 1996.
  39. OKAMOTO H, SUGIYAMA Y, OKADA S et al: Typing hepatitis C virus by polymerase chain reaction with type-specific primers: application to clinical surveys and tracing infectious sources. *J Gen Virol* 1992; 73: 673-9.
  40. OKAMOTO H, TOKITA H, SAKAMOTO M et al: Characterisation of the genomic sequence of type V (or 3a) hepatitis C virus isolates and PCR primers for specific detection. *J Gen Virol* 1993; 74: 2385-90.
  41. SCHEUER PJ: Classification of chronic viral hepatitis: a need for reassessment. *J Hepatol* 1991; 13: 372-4.
  42. DESMET VJ, GERBER M, HOOFNAGLE JH, MANNS M, SCHEUER PJ: Classification of chronic hepatitis: diagnosis, grading and staging. *Hepatology* 1994; 19: 1513-20.
  43. KNOPELL RG, ISHAK KG, BLACK WC, CHEN TS et al: Formulation and application of a numerical scoring system for assessing histological activity in asymptomatic chronic active hepatitis. *Hepatology* 1981; 1: 431-5.
  44. LAU JYN, MIZOKAMI M, KÖLBERG JA, DAVIS GL et al: Application of six hepatitis C virus genotyping systems to sera from chronic hepatitis C patients in the United States. *J Infect Dis* 1995; 171: 281-9.
  45. MAHANEY K, TEDESCHI V, MAERTENS G, DiBISCEGLIE AM, VERGALLA J, HOOFNAGLE JH, SALLIE R: Genotypic analysis of hepatitis C virus in American patients. *Hepatology* 1994; 20: 1405-11.
  46. NOUSBAUM JB, POL S, NALPAS B, LANDAIS P, BERTHELOT P, BRÉCHOT C and the Collaborative Study Group: Hepatitis C virus type 1b (II) infection in France and Italy. *Ann Intern Med* 1995; 122: 161-8.
  47. LEBRE L, NASCIMENTO C, MENESES-OLIVEIRA C et al: Prevalência de genótipos e histologia da hepatite C numa consulta de Medicina (Abstract). *GE-J Port Gastroenterologia* 1996; 3 (supl.): 66.
  48. RAMALHO F, SEREJO F, RAIMUNDO M, MARINHO R et al: - Genótipos do vírus da hepatite C - sua importância na forma de transmissão e na gravidade da doença hepática. *GE-J Port Gastroenterologia* 1997; 4: 70-76.
  49. SHAKIL AO, CONRY-CANTILENA C, ALTER HJ, HAYASHI P et al: Volunteer blood donors with antibody to hepatitis C virus: clinical, biochemical, virologic, and histologic features. *Ann Intern Med* 1995; 123: 330-7.
  50. RODRIGUES B, BAPTISTA C, FIGUEIREDO A, MOURA A et al: Genótipos do vírus da hepatite C e parâmetros de gravidade da hepatite crónica viral C. Estudo preliminar numa população portuguesa. *Arq Hepato-Gastroenterológicos Port* 1995; 4: 247-55.
  51. AREIAS J, PEDROTO I, FREITAS T et al: Caracterização virológica dos portadores assintomáticos do vírus da hepatite C (VHC) (Abstract). *GE-J Port Gastroenterologia* 1996; 3 (supl.): 51.
  52. CALINAS F, ALVES M, RODRIGUES-L, PENEDA J: Genótipos do vírus da hepatite C - características epidemiológicas (Abstract). *GE-J Port Gastroenterologia* 1996; 3 (supl.): 63.
  53. PEIXE P, MATOS L, VAZ PATTO J et al: Genótipo do vírus da hepatite C. Contributo para o estudo da prevalência (Abstract). *GE-J Port Gastroenterologia* 1996; 3 (supl.): 64.
  54. MACEDO G, LOUREIRO A, MORAIS G, TORRES C: Genótipo do vírus da hepatite C em hemodialisados (Abstract). *GE-J Port Gastroenterologia* 1996; 3 (supl.): 65.
  55. SILINI E, BONO F, CIVIDINI A et al: Differential distribution of hepatitis C virus genotypes in patients with and without liver function abnormalities. *Hepatology* 1995; 21: 285-90.
  56. OKANGUE T, YASUI K, SAKAMOTO S, MINAMI M et al: Circulating HCV-RNA, HCV genotype, and liver histology in asymptomatic individuals reactive for anti-HCV antibody and their follow-up study. *Liver* 1996; 16: 241-7.
  57. POL S, THIERS V, NOUSBAUM J-B, LEGENDRE C, BERTHELOT P, KREIS H, BRÉCHOT C: The changing relative prevalence of hepatitis C virus genotypes: evidence in hemodialysed patients and kidney recipients. *Gastroenterology* 1995; 108: 581-3.
  58. SILINI E, BONO F, CIVIDINI A, CERINO A et al: Molecular epidemiology of hepatitis C virus infection among intravenous drug users. *J Hepatol* 1995; 22: 691-5.