

Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar

Largo Prof. Abel Salazar, nº2, 4099-003, Porto

Dissertação do Mestrado Integrado em Medicina

Revisão Bibliográfica do tema:

***SUBSTÂNCIAS ADITIVAS COMO FACTORES
DE PROGRESSÃO DA HEPATITE C CRÓNICA***

Aluno: Ana Isabel Gomes Ferreira

E-mail: anaisabelferreira333@gmail.com

Orientador: Dra. Júdit Gandara

Porto

19 de Junho de 2009

RESUMO

O curso da hepatite C crónica é altamente variável entre indivíduos como consequência da interacção de numerosos factores relacionados com o hospedeiro, com o vírus e com o ambiente. Os últimos têm sido exaustivamente investigados com o intuito de melhorar o prognóstico da doença, particularmente em pacientes que respondem mal ao tratamento.

O objectivo deste trabalho é a realização de uma revisão sistemática sobre a influência dos factores ambientais no risco de progressão da hepatite C crónica numa perspectiva epidemiológica e patofisiológica.

Durante a última década, vários estudos mostraram que a associação da infecção pelo vírus da hepatite C com o consumo de elevadas quantidades de álcool pode resultar numa aceleração sinérgica da fibrose hepática. Adicionalmente, dados recentes indicam que mesmo quantidades leves a moderadas de álcool podem acelerar a progressão da doença. Foi também sugerido que o tabaco possa aumentar o grau necroinflamatório em pacientes com hepatite C crónica, contribuindo, deste modo, para a progressão fibrótica. Esta suposição assenta sobretudo em evidências epidemiológicas na ausência de estudos patogénicos. Finalmente, o consumo de cannabis emergiu recentemente como uma nova co-morbilidade em pacientes com hepatite C crónica. Na verdade, o consumo regular de cannabis parece ser um factor preditivo da severidade da esteatose e da fibrose em pacientes infectados. Estudos experimentais têm sugerido um papel dos receptores cannabinóides na progressão da fibrose suportando os achados epidemiológicos prévios.

Em conclusão, numerosos estudos demonstram uma associação entre o consumo de álcool, tabaco e cannabis e vírus da hepatite C sendo que, de uma forma geral, todos os pacientes deverão ser informados do impacto deletério do consumo destas substâncias na sua doença e deverá ser-lhes oferecido suporte apropriado.

Palavras-chave: Hepatite C crónica; Vírus da hepatite C; Fibrose; Álcool; Tabaco; Cannabis.

INTRODUÇÃO

A hepatite C é uma doença de grande impacto epidemiológico afectando cerca de 170 milhões de pessoas em todo o mundo. É causa de aproximadamente 40% das hepatites crónicas e constitui a indicação mais frequente de transplante hepático (Kasper *et al* – 2006).

A mortalidade associada à hepatite C crónica resulta sobretudo do desenvolvimento de fibrose e da ocorrência subsequente de cirrose e suas complicações, sendo de extrema importância avaliar o risco individual de progressão da doença. Vários factores têm sido associados à progressão da doença, seja pelas suas propriedades pro-fibrogénicas ou pela redução da taxa de resposta à terapia anti-viral:

- Factores relacionados com o hospedeiro: idade superior a 40 anos e sexo masculino;
- Factores relacionados com o vírus: duração da infecção;
- Co-morbilidades: co-infecção pelo HIV, imunossupressão, elevado Índice de Massa Corporal (IMC), resistência à insulina e diabetes;
- Factores ambientais: Consumo de álcool, tabaco e cannabis.

Os factores ambientais assumem especial importância, pois é sobretudo neles que a intervenção é possível. Apesar do seu controlo em doentes infectados pelo vírus da hepatite C (VHC) nem sempre ser fácil, pode, em alguns casos, ser uma das poucas alternativas terapêuticas, particularmente em doentes que respondem mal à terapia anti-viral.

Os efeitos da ingestão alcoólica têm sido alvo de numerosos estudos durante a última década, enquanto que o consumo de tabaco e o uso de canabinóides têm emergido como novos co-factores de progressão da doença, mais recentemente.

OBJECTIVO

Este trabalho tem como objectivo principal uma abordagem aos factores de progressão da hepatite C crónica, nomeadamente no que se refere ao consumo de substâncias aditivas numa perspectiva epidemiológica e patofisiológica.

DESENVOLVIMENTO

PROGRESSÃO DA HEPATITE C CRÓNICA

1. História natural da doença

Cerca de 85 a 90% dos casos de hepatite C aguda evoluem para a cronicidade e destes 30% vão desenvolver cirrose. A taxa de incidência de carcinoma hepatocelular nos pacientes cirróticos infectados pelo vírus da hepatite C (VHC) varia de 1 a 4%. Apesar destes dados, sabe-se que a história natural da doença é variável. (Kasper *et al* – 2006)

Como evidenciado num estudo transversal de Polinard *et al* (1997) realizado com base na observação da taxa de progressão da doença em 2235 pacientes não tratados com evidência histológica de infecção, a hepatite C crónica é mais uma doença fibrótica progressiva do que uma inflamação persistente. A fibrose, ao contrário do grau histológico, parece evoluir de uma forma quase linear ao longo do tempo com uma taxa de progressão fibrótica de 0,133 unidades ao ano (U/ano) (considerando a Classificação de METAVIR de 4 estadios). No entanto, a sua taxa de progressão não segue uma distribuição normal, sugerindo a presença de evoluções distintas para a mesma doença, que variam das formas lentamente progressivas às mais graves associadas a alta taxa de progressão fibrótica. Ainda segundo o mesmo estudo, o tempo mediano de desenvolvimento de cirrose foi de cerca de 30 anos. O estudo retrospectivo de Zarsky *et al* (2003) com 180 pacientes com infecção pelo VHC histologicamente comprovada estudados com o objectivo de estabelecer a taxa de progressão da fibrose, é em grande parte concordante com o anterior. No entanto, no que se refere à evolução da fibrose, este trabalho aponta para uma evolução não tão linear mas com progressiva aceleração nos estadios mais tardios da doença. Uma outra conclusão deste estudo é a evidência de que seja necessário um intervalo de pelo menos 4 a 5 anos para que se detecte uma mudança de uma unidade no grau de fibrose (Segundo a classificação de METAVIR).

Segundo o estudo *cohort* de Harris *et al* (2002) baseado em 924 pacientes submetidos a transfusão sanguínea divididos em dois grupos, portadores ou não do VHC, a infecção não teve um grande impacto na sobrevida dos doentes durante a primeira década pós transfusão, sendo que as taxas de mortalidades em ambos os grupos foram similares. Por outro lado, evidências apontam para um aumento substancial da mortalidade nos pacientes cirróticos. As complicações associadas são responsáveis por este quadro sombrio e estima-se que a sobrevida em 10 anos (após diagnóstico de cirrose) se aproxime dos 80%, sendo que a mortalidade ocorre a um ritmo de 2 a 6% ao ano.

2. Mecanismos moleculares do dano hepático causado pelo VHC

Há seis espécies de VHC, com genótipos distintos, capazes de causar a doença e dentro de cada uma delas existem variações, originadas da elevada taxa de mutação, que vão dar origem às quase-espécies. São estas mutações que permitem o escape à imunidade do hospedeiro e a diminuição da resposta à terapia anti-viral. Apesar de se tratar de um tema um pouco controverso, emergiu um consenso que apoia o papel predominante das células T Auxiliares CD4 activadas pelo vírus que estimulam, através de citocinas as células T Citotóxicas CD8 – VHC específicas. Além disso, as proteínas do VHC interferem na imunidade inata bloqueando algumas cascatas sinalizadoras e accionando as células *Natural Killer*. A falha das respostas imunes adaptativas correlaciona-se com a persistência da inflamação e necrose do tecido hepático que, se ultrapassarem os 6 meses de evolução, permitem o diagnóstico de hepatite C crónica. Histologicamente a progressão da doença caracteriza-se por fibrose portal com lesões em ponte e desenvolvimento de nódulos. A nível morfológico, a fibrose resulta tanto da acumulação de matriz extracelular como da angiogénese a ela inerente. (Kasper *et al* – 2006)

O acúmulo de matriz extracelular faz-se por várias etapas (Lotersztajn *et al* – 2005). Durante a resposta imune ao dano hepático, as células de *Kupfer* activadas, células endotéliais, plaquetas e células mononucleares geram radicais livres de oxigénio, um número substancial de citocinas como o TGF- β , IL-1, TGF- α e factores de crescimento, que em conjunto vão promover a activação células envolvidas na

fibrogénese, nomeadamente as células estelares e fibroblastos. Estas células, uma vez activadas, acumulam-se em áreas de necrose e secretam uma variedade de citocinas proinflamatórias. Há factores de transcrição que são cruciais nesta etapa dos quais se destaca o factor nuclear kB (NF-kB), uma proteína complexa envolvida na resposta celular a vários estímulos como citocinas, radicais livres e antígenos virais ou bacterianos. Tanto as células estelares, como os fibroblastos possuem um elevado potencial mitogénico e escapam facilmente à apoptose. Assim, vão-se acumulando em pontos críticos do tecido hepático interferindo num ciclo de feed-back positivo. As células estelares activadas expressam uma grande quantidade de metaloproteinases (MMP) e inibidores das metaloproteinases (TIMP) que, em conjunto, vão promover o acúmulo de matriz extracelular.

A angiogénese é também outra componente importante da fibrose hepática (Lotersztajn *et al* – 2005). Em resposta ao dano hepático induzido pela inflamação, as células do parênquima e as células estelares activadas expressam factores de crescimento endoteliais vasculares (VEGF) e seus receptores. O VEGF aumenta a permeabilidade vascular, facilita a migração de proteínas do plasma e de células endoteliais que são essenciais na formação de tecido fibrótico. Adicionalmente, as células endoteliais e as células estelares activadas podem proliferar em resposta ao VEGF dando origem, uma vez mais, a um ciclo de feed-back positivo.

SUBSTÂNCIAS ADITIVAS COMO FACTORES DE PROGRESSÃO DA HEPATITE C CRÓNICA

1. Álcool

1.1. Epidemiologia

O estudo do impacto do consumo de álcool no dano hepático associado à hepatite C crónica tem sido alvo de numerosos trabalhos elaborados durante a última década, dada a sua frequente coexistência.

Um estudo longitudinal realizado por Campebell *et al* (2006) envolvendo 598 consumidores de drogas injectáveis seropositivos para o VHC demonstrou que o abuso de álcool neste grupo é superior ao da população em geral com uma frequência rondando os 40%, registando-se valores superiores entre os mais novos. Já o estudo de Rosman *et al* (1996) conseguiu evidenciar uma alta taxa de seropositividade para o VHC em alcoólicos sem comportamentos de risco. Porém, permanece a dúvida se esta associação representa verdadeiramente o impacto do álcool na progressão da doença, uma vez que estes dados podem reflectir apenas a presença de comportamentos de risco entre os alcoólicos (que dessa forma estariam mais expostos ao VHC) e o comprometimento da sua imunidade (associada a uma diminuição da clearance viral). O estudo transversal elaborado por Piasecki *et al* (2004) comparando um grupo de pacientes com remissão da infecção e outro com doença activa contribuiu para o esclarecimento da associação. Conseguiu demonstrar que uma história de abuso recente ou passado de álcool está intimamente associada à infecção por VHC e à sua progressão, uma vez que obteve taxas de consumo estatisticamente superiores na amostra de pacientes com doença em actividade.

1.2. Impacto do consumo de álcool no prognóstico

Há evidência de que o álcool actue sinergicamente com o VHC no dano hepático, afectando o prognóstico e a resposta terapêutica

O impacto negativo do consumo de álcool na sobrevida de doentes com hepatite C foi demonstrado em vários trabalhos. O estudo de Ray Kim *et al* (2001) mostrou que a presença simultânea de infecção pelo VHC e abuso de álcool estão associados a um aumento de 40% do risco de morte e a uma idade menor à data do internamento para a primeira biopsia em comparação com os doentes não alcoólicos. O estudo retrospectivo de Tsui *et al* (2007) concluiu que a mortalidade em pacientes hospitalizados por dependência do álcool bem como o seu tempo de internamento é 1,41 vezes superior naqueles que têm simultaneamente infecção por VHC. Adicionalmente, o estudo *cohort* de Harris *et al* (2002), apesar de não ter obtido uma diferença estatisticamente significativa, demonstrou que o consumo de álcool está associado a uma taxa de mortalidade superior por doenças hepáticas.

A quantidade de álcool parece ser um factor decisivo na progressão da doença. Numerosos estudos mostraram que a ingestão de elevadas quantidades de álcool está intimamente relacionada com o grau de fibrose. De acordo com Corrao and Aricò (1998), a interacção entre o etanol e o VHC tem um efeito aditivo na promoção de cirrose para doses diárias de cerca de 50g, mas o efeito torna-se sinérgico para quantidades acima de 125g por dia. Na análise retrospectiva de Polinard *et al* (1997), o consumo de mais de 50 g de álcool foi um factor independente de progressão da doença com um aumento da taxa de progressão fibrótica de 0,125 na amostra não consumidora para 0,167 na amostra consumidora. Da mesma forma, os estudos retrospectivos de Roudot-Thoraval *et al* (1997) e Harris *et al* (2001) mostraram um risco maior de cirrose em pacientes consumidores de elevadas quantidades de álcool. Estes estudos, porém, têm a limitação de serem retrospectivos e estarem sujeitos a vieses, particularmente no que se refere a definições de quantidade de álcool consumida e intervalos de tempo por parte dos objectos do estudo (viés de *recall*). No entanto, alguns estudos prospectivos apoiam estas conclusões, como é o caso do estudo *cohort* realizado por Zarski *et al* (2003). Segundo este trabalho, o consumo de álcool, mesmo em quantidades moderadas a baixas, correlaciona-se independentemente com a progressão da fibrose em pacientes com VHC.

Níveis moderados ou baixos de consumo de álcool têm sido alvo de um menor número de estudos pelo que a relação causa-efeito não é tão clara. Hezode *et al* (2003) realizaram um estudo prospectivo onde avaliaram factores preditivos de fibrose (maior ou igual a F2 segundo a escala METAVIR) em 260 pacientes com um consumo diário menor que 50 g de álcool durante 6 meses. Nesta análise o consumo de 31 a 50g diárias de álcool foi um forte factor de risco para o grau de fibrose. Mais recentemente, uma meta-análise englobando 13706 pacientes realizada por Monto *et al* (2004) concluiu que a relação entre a quantidade de álcool consumida diariamente e a progressão da doença é mais forte quanto maior a quantidade de álcool ingerida diariamente, com um espectro de graus contínuos de fibrose desde os não consumidores aos consumidores pesados. Porém, as diferenças não foram estatisticamente significativas.

O tempo de duração da ingestão alcoólica e o padrão de consumo parecem também alterar o risco de progressão da doença. O estudo de Ostapowicz *et al* (1998), apesar de não ter encontrado uma relação estatisticamente significativa, demonstrou que a quantidade total de álcool consumida durante a vida era factor de risco para cirrose

independentemente da duração da hepatite C. O estudo retrospectivo de Westin *et al* (2002) demonstrou também que a quantidade total de álcool consumida, a quantidade por ocasião, bem como a frequência são factores independentes de progressão da fibrose, mesmo que a quantidade diária seja moderada ou baixa.

Resumindo, não parece existir um nível máximo que permita definir um grupo de consumidores de álcool que não esteja sob risco acrescido de progressão da doença.

1.3. Impacto do consumo de álcool na resposta ao tratamento

A terapia anti-viral está indicada em pacientes com hepatite C crónica que possuem RNA do VHC identificável no soro associado a um grau de fibrose pelo menos moderado (fibrose portal ou coalescente). O tratamento padrão é uma associação de Peg-interferona (PEG INF) mais Ribavarina (Kasper *et al* – 2006).. A taxa de resposta virológica de um doente submetido à terapia combinada varia de 35 a 50%.

O consumo de álcool parece diminuir a resposta ao tratamento. No entanto, quando a terapia antiviral é realizada em combinação com programas de desintoxicação este efeito deletério é suavizado. Os mecanismos propostos para a diminuição da resposta são a redução da sensibilidade ao PEG INF e/ou a adesão ao tratamento em pacientes alcoólicos. Adicionalmente, há evidências de que a diminuição da resposta ao tratamento possa ser dose-dependente.. É preciso ter em conta, no entanto, que a grande parte dos estudos realizados é retrospectiva, frequentemente com amostras reduzidas, submetidas a monoterapia com INF e como tal devem ser alvo de uma avaliação criteriosa.

O estudo de Anand *et al* (2006) foi o primeiro estudo *cohort* prospectivo realizado com o objectivo de avaliar a resposta terapêutica em doentes alcoólicos. Foram estudados 4061 pacientes infectados pelo VHC dos quais 726 foram submetidos ao tratamento combinado com INF α mais Ribavarina. A amostra foi categorizada consoante o consumo de álcool diário e a exposição (recente ou passada). A adesão ao tratamento e a taxa de resposta viral sustentada foram similares nos abstémios e naqueles expostos no passado. Pelo contrário, o consumo recente de álcool esteve associado a um aumento da interrupção da terapia e a uma menor resposta viral. Contudo, os pacientes alcoólicos que conseguiram completar o tratamento obtiveram taxas de resposta semelhantes aos abstémios, sugerindo que a exposição está mais

relacionada com a diminuição da adesão terapêutica do que com a alteração da sensibilidade ao INF. Uma outra conclusão importante deste estudo foi que os médicos são mais relutantes em incluir os consumidores de álcool (passados ou recentes) nos programas terapêuticos.

1.4. Mecanismos moleculares de interacção álcool-VHC

Apesar de restarem poucas dúvidas quanto à associação epidemiológica entre álcool e VHC, a patofisiologia e a base molecular da interacção ainda não estão completamente esclarecidas. Os mecanismos pelos quais o álcool parece contribuir para o dano hepático incluem a potencialização da replicação viral, o aumento do stress oxidativo e da citotoxicidade, e uma alteração da resposta imune do hospedeiro.

Vários estudos foram bem sucedidos na tentativa de demonstrar níveis séricos aumentados de RNA viral nos consumidores de álcool. O estudo experimental de Zhang *et al* (2003) realizado com base num sistema celular *in vitro* mostrou que os metabolitos do etanol potenciam a replicação viral actuando sobretudo no RNA mensageiro através de dois mecanismos. O primeiro baseia-se na capacidade do etanol activar o NF- κ B, um importante factor de transcrição sensível ao equilíbrio redox que também actua na produção de citocinas. O segundo baseia-se na constatação de que a morfina, quando adicionada a culturas celulares infectadas, aumenta a expressão do RNA do VHC nessas células. Ora, sabendo que o álcool activa o sistema opióide endógeno responsável pelos efeitos aditivos desta substância, é possível também que este seja um dos mecanismos que promovam o aumento da replicação viral. Contudo, outros estudos como o de Anand *et al* (2006) falharam em demonstrar títulos mais elevados entre os consumidores.

O consumo de álcool bem como a infecção pelo VHC são responsáveis pela estimulação do stress oxidativo e peroxidação lipídica, sugerindo que a presença dos dois factores em simultâneo possa multiplicar este efeito. Perlemuter *et al* (2003) realizaram um estudo baseado em ratos transgénicos para a core proteína do VHC submetidos à administração crónica de álcool. Conseguiram demonstrar que a presença simultânea do vírus e do álcool aumenta a peroxidação lipídica de uma forma mais potente do que cada um deles isolados. Sabendo que os produtos reactivos da peroxidação lipídica são co-factores de algumas alterações somáticas e mutações

cromossómicas, a interação álcool-VHC pode ainda assumir um papel importante na patogénese do carcinoma hepatocelular em pacientes infectados. Foi demonstrado ainda que a associação é responsável por um aumento do TGF- β e da activação das células estelares. O álcool parece potenciar, desta forma, várias etapas do stresse oxidativo sugerindo que o seu efeito não deve ser apenas aditivo ao VHC, mas sim sinérgico. Segundo o estudo de Rigamonti *et al* (2003), que envolveu 145 doentes infectados cronicamente pelo VHC, a quantidade sérica de anticorpos contra os produtos da peroxidação lipídica foi significativamente superior entre os pacientes consumidores de álcool, e, apesar de ser verdade para quantidades moderadas, variou directamente com a quantidade de etanol consumida diariamente. Este trabalho permitiu ainda demonstrar uma correlação significativa entre os títulos de radicais oxidativos e a severidade da inflamação/fibrose.

Dados experimentais sugerem que a alteração da imunidade do hospedeiro possa contribuir para as altas taxas de persistência da infecção pelo VHC encontradas nos consumidores de álcool. O estudo de Aloman *et al* (2007) realizado em ratos cronicamente expostos ao etanol mostrou uma redução da resposta imune celular, sobretudo devido a alterações na maturação das células dendríticas, modificando, por sua vez, a resposta dos linfócitos T auxiliares.

2. Tabaco

2.1. Epidemiologia

A associação epidemiológica entre consumo de tabaco e hepatite C crónica não é tão clara como a do álcool, tendo sido alvo de um número bem menor de estudos. O estudo *cohort* de Fujita *et al* (2006) realizado com base em 110792 pessoas seleccionadas em 45 áreas do Japão, embora não tenha encontrado diferenças estatisticamente significativas, demonstrou que a percentagem de fumadores, o tempo de consumo e o número de cigarros consumidos ao dia são superiores entre os infectados pelo VHC do que nos não infectados. Outros estudos como o de Pessione *et al* (2001) mostram

percentagens de fumadores inequivocamente mais elevadas em indivíduos com hepatite C crónica.

2.2. Impacto do consumo de tabaco no prognóstico

A alteração do prognóstico da infecção crónica pelo VHC por influência do tabaco ainda não está completamente esclarecida. Porém, numerosos estudos têm demonstrado um impacto negativo da nicotina em outras lesões hepáticas crónicas. Um dos primeiros trabalhos realizados neste âmbito foi o de Klatsky *et al* (1992), que demonstrou através de uma análise retrospectiva que a nicotina tem um efeito negativo na prevalência e na severidade da cirrose alcoólica. Mais tarde, um estudo prospectivo de Yu *et al* (1997) realizado com o objectivo de estudar a progressão da hepatite B, conclui que o tabaco concorre inequivocamente para o desenvolvimento de cirrose nestes pacientes. O estudo *cohort* de Zein *et al* (2006), que englobou 269 pacientes com cirrose biliar primária, demonstrou que o tabaco pode acelerar a progressão desta doença. Sugeriu ainda que a dose é importante, uma vez que no subgrupo de fumadores de mais de 10 maços/ano a taxa de fibrose avançada foi de 79% contra apenas 27% no grupo composto de consumidores de menos de 10 maços/ano mais os não consumidores. Alguns estudos demonstraram também que o tabaco pode intervir na progressão da cirrose para carcinoma hepatocelular.

Por sua vez, a curso da hepatite C também pode ser afectado pelo consumo de tabaco. Recentemente, o estudo de Dev *et al* (2006) envolvendo 170 pacientes com hepatite C crónica demonstrou uma forte associação entre o consumo de tabaco e estadios mais elevados de fibrose, numa análise multivariada ajustada à idade. Ainda segundo este trabalho, o tabaco não esteve significativamente associado a outros factores de progressão fibrótica, como a idade ou o sexo masculino.

Segundo o estudo de 310 pacientes infectados pelo VHC realizado por Pessione *et al* (2001), o tabaco foi factor independente de progressão de fibrose e aumento do grau necroinflamatório em análises multivariadas ajustadas à idade. Porém, a relação estabelecida entre tabaco e estadio fibrótico desapareceu quando o grau de actividade foi incluído na análise. Por sua vez, o estudo prospectivo de Hezode *et al* (2003) encontrou uma associação estatisticamente significativa entre tabaco e severidade histológica, mas não entre tabaco e estadio fibrótico. Os dados destes dois trabalhos

sugerem que o efeito pró-fibrótico do tabaco na patogenia da hepatite C crónica não seja directo, mas indirectamente devido a um aumento da actividade necroinflamatória.

A análise de Pressione *et al* (2001) mostrou ainda que a progressão da fibrose é afectada pela nicotina de uma forma dose-dependente, sendo que os pacientes consumidores de mais de 15 maços/ano possuíam um risco 2 vezes maior que os não fumadores. Porém, à semelhança do que acontece com o abuso de álcool, não existe um número máximo de cigarros consumidos ou tempo de uso que permita estabelecer um limite de segurança.

A taxa de mortalidade parece ser influenciada pelo consumo de tabaco, como sugerido pelo estudo de Fujita *et al* (2006) que englobou 110792 pessoas divididas em grupos consoante a positividade para o anti-VHC e a história de consumo de tabaco. Conclui que o risco de morte por carcinoma hepatocelular nos pacientes com hepatite C crónica é superior tanto para os fumadores (OR=9,6) como para os ex-fumadores (OR=7,84). Não conseguiu demonstrar, porém, diferenças estatisticamente significativas entre os subgrupos de pacientes no que se refere à dose diária de tabaco consumida e ao tempo total de consumo.

2.3. Mecanismos moleculares de interacção tabaco-VHC

Os mecanismos subjacentes ao efeito do tabaco na progressão da hepatite C crónica e no desenvolvimento de outras patologias hepáticas são pouco conhecidos devido à ausência de dados experimentais. No entanto, estudos realizados em outros tecidos mostram que o tabaco é responsável pela progressão ou agravamento de certas doenças, o que, teoricamente, pode sugerir um dano hepático semelhante. O estudo de Agarwal (2005) baseado em 35 doentes com nefropatia diabética mostrou que o tabaco altera várias etapas da resposta à lesão tecidual como o stresse oxidativo e o estado inflamatório. Neste trabalho, os níveis de malondialdeído (MDA), um produto da peroxidação lipídica com acção citotóxica e genotóxica, de Interleucina 6 (IL6) e Proteína C reactiva foram significativamente maiores no grupo de fumadores. Já o estudo experimental de Yang *et al* (2006) conseguiu demonstrar que o tabaco aumenta a produção de citocinas inflamatórias como a IL8 e o TNF α por intermédio da activação do NF- κ B e pela alteração do estado redox das células.

O estudo retrospectivo de Dev *et al* (2006) investigou a relação entre o tabaco e a fibrose em pacientes infectados pelo VHC. Foram doseados os níveis de factores de crescimento endotelial vascular (VEGF) que se mostraram mais elevados no grupo de fumadores. Deste modo, foi sugerido que o tabaco possa promover a angiogénese, uma importante etapa da fibrose hepática, por intermédio da activação do VEGF.

3. Cannabis

3.1. Epidemiologia

A cannabis e seus derivados constituem, actualmente, as drogas ilícitas mais consumidas no mundo ocidental. Na maior parte das vezes a cannabis é consumida por adolescentes ou jovens adultos por um período de tempo limitado. A prevalência de consumo tem vindo a aumentar nos últimos 30 anos nos países ocidentais, particularmente nas faixas etárias mais avançadas. Estima-se que nos EUA a prevalência ronde os 4% com percentagens superiores nos mais jovens.

O estudo de Hezode *et al* (2005) foi um dos poucos trabalhos que analisou a prevalência do uso de cannabis entre os indivíduos infectados cronicamente pelo VHC. Encontrou uma prevalência de 32 % de consumidores diários e de 17 % de consumidores ocasionais, percentagens inequivocamente superiores às da população em geral. Do mesmo modo, 13,7% dos pacientes incluídos no estudo de Ishida *et al* (2008) consumiam cannabis diariamente enquanto que 45,1% consumiam ocasionalmente.

3.2. Impacto do consumo de cannabis no prognóstico

Há poucos estudos elaborados com o objectivo de avaliar o efeito da cannabis na progressão da fibrose associada à infecção pelo VHC. O estudo transversal de Hezode *et al* (2005) englobou 270 pacientes com hepatite C crónica não tratada e de duração conhecida submetidos a biopsia hepática. Foram recolhidos dados demográficos, história de exposição a factores de risco, parâmetros metabólicos e genótipo viral. Os pacientes foram categorizados como não consumidores, consumidores ocasionais e

consumidores diários de cannabis. O consumo diário de cannabis foi factor de risco independente para a fibrose severa (maior ou igual que F3 na escala METAVIR) e para progressão rápida da fibrose (definida como taxa de progressão superior a 0,15 U/ano), enquanto que o consumo ocasional de cannabis não esteve associado a um risco superior de progressão fibrótica. Uma das limitações deste estudo foi a ausência de investigação do impacto da cannabis para estadios de fibrose leve e moderada. Mais recentemente, no estudo transversal de Ishida *et al* (2008), que englobou 204 pacientes infectados pelo VHC, o consumo diário de cannabis foi factor de risco independente para estadios fibróticos moderados a severos (F3-6, segundo o método de Ishak). Por outro lado, não se encontraram diferenças estatisticamente significativas nas taxas de consumo entre os pacientes que possuíam graus leves de fibrose e aqueles sem fibrose. Estes dados sugerem um efeito mínimo ou nulo da cannabis em estadios de fibrose precoces mas crescente à medida que a severidade da doença aumenta.

No estudo de Ishida *et al* (2008), o consumo diário de cannabis foi estatisticamente superior em pacientes com hepatite C co-infectados pelo HIV quando comparados com aqueles que possuíam apenas infecção pelo VHC. Adicionalmente, o uso diário de cannabis em associação com o consumo de elevadas quantidades de álcool pareceu exibir um efeito sinérgico na progressão da fibrose. Assim sendo, se é importante diminuir o consumo de cannabis pelos pacientes portadores do VHC, parece ser ainda mais vantajoso fazê-lo naqueles que possuem simultaneamente VIH ou que também consumam álcool.

3.3. Sistema endocanabinóide

A cannabis é fonte de mais de 60 compostos, dos quais se destaca o Δ^9 -tetrahydrocannabinol (THC), o maior responsável pelos efeitos psicoativos da planta. Foram identificados dois receptores de membrana pertencentes à superfamília dos receptores de membrana ligados à proteína G (GPCR; *G-Protein-Coupled-Receptor*) com afinidade semelhante para o THC designados por receptores CB1 e CB2. A activação desses receptores estimula as proteínas cínases que, modulando a actividade de alguns genes, são responsáveis pelos efeitos dos cannabinóides.

Não só a cannabis como também um grupo de ligandos lipídicos endógenos, conhecidos como endocanabinóides, são capazes de activar este sistema. Os principais

endocanabinóides conhecidos são a Anandamida (N-aracdonoil etanolamina) e o 2-AG (2-aracdonoil Glicerol), ambos derivados dos ácidos gordos de cadeia longa. Essas substâncias não estão confinadas no SNC, mas também agem como mediadores locais, de forma autócrina e parácrina em muitos outros tecidos, sendo produzidos por demanda após alterações agudas ou crónicas da homeostasia celular.

Os efeitos da activação do sistema endocanabinóide são vários. Via receptor CB1, os endocanabinóides são responsáveis por alterações autonómicas e sensitivas, (nomeadamente o alívio da dor, vasodilatação e efeito anti-emético), pela activação de mecanismos reguladores da fome e pelos efeitos psicoactivos. A activação do receptor CB2, por sua vez, vai regular a resposta imune celular e humoral e presume-se que actue também na inflamação e dor crónica. (Di Marzo *et al* – 2004)

3.4. Mecanismos moleculares de interacção cannabis –VHC

Alguns estudos efectuados durante a última década mostraram que a distribuição dos receptores CB1 e CB2 é menos restrita do que antes se pensava, responsabilizando o sistema endocanabinóide por uma variedade de condições fisiológicas e patológicas.

Há poucas evidências sobre a acção dos cannabinóides a nível hepático. Os receptores CB1 parecem estar presentes nas células endoteliais hepáticas e, como sugerido por Batkai *et al* (2001), a sua densidade aumenta no fígado cirrótico. Este dado sugeriu a hipótese de que os receptores cannabinóides possam estar associados, de algum modo, ao dano hepático.

Dois estudos experimentais investigaram *in vivo* a influência da activação e do antagonismo dos receptores CB1 e CB2 em ratos geneticamente manipulados. O estudo experimental de Julien *et al* (2005) deu a primeira evidência da presença dos receptores CB2 no fígado humano cirrótico, expressos nos miofibroblastos e nas células estelares activadas situadas nos septos fibrosos. Os autores mostraram também que a activação dos receptores CB2 tem efeito anti-fibrogénico promovendo a inibição do crescimento e induzindo a apoptose de uma forma dose-dependente. Na ausência do receptor ou na presença de um antagonista são obtidos níveis mais severos de fibrose. Foi sugerido que a anandamida e o 2-AG participassem nessa activação. Porém estes endocanabinóides exercem as suas funções em células desprovidas de receptores CB2, sugerindo que o efeito destes seja independente da sua ocupação. Apesar dos mecanismos moleculares

pelos quais o receptor CB2 exerce os seus efeitos ainda não estarem completamente esclarecidos, este estudo identificou a indução da COX-2 e do stress oxidativo como possíveis mecanismos para a inibição do crescimento celular e apoptose, respectivamente. Sabendo que estatisticamente o consumo de cannabis está associado a um risco aumentado de progressão fibrótica e que os receptores CB2 exercem uma acção protectora, foi levantada a hipótese de que os receptores CB1 estivessem envolvidos na promoção da fibrose. O estudo de Teixeira-Clerc *et al* (2006) demonstrou que a indução dos receptores CB1 está aumentada no fígado humano cirrótico, em especial nas células fibrogénicas localizadas nos septos fibróticos (à semelhança do que acontece com os receptores CB2). Em culturas celulares, o CB1 aumenta a proliferação de miofibroblastos e de células estelares promovendo a sua sobrevivência. O tratamento com antagonistas está associado a uma diminuição da resposta necroinflamatória e a uma inibição da progressão da fibrose. Os mecanismos moleculares associados à diminuição da fibrose parecem basear-se numa diminuição do TGF- β 1 e numa redução do acúmulo de células fibrogénicas. Mais uma vez, a acção dos receptores CB1 mostrou-se independente da ligação de endocanabinóides. Reunindo as conclusões destes dois estudos, os receptores CB1 e CB2 parecem ter efeitos opostos, sugerindo que o consumo de cannabis altere a taxa de progressão fibrótica em razão do equilíbrio de ambas as acções.

Foi proposto que o sistema endocanabinóide por intermédio da anandamina pudesse estar implicado na vasodilatação associada à cirrose. O estudo experimental de Bátkai *et al* (2001) mostrou um aumento dos níveis deste endocanabinóide em ratos com fígados cirróticos. Porém, o estudo caso-controlo de Rodriguez *et al* (2004) falhou ao tentar demonstrar que níveis elevados de anandamina estão associados à vasodilatação arterial periférica e à severidade da hipertensão portal em doentes cirróticos.

Foi sugerido ainda, por intermédio de estudos experimentais, que a cannabis possa interferir na progressão da hepatite C crónica por promover a esteatose hepática, um achado histológico comum em pacientes infectados pelo VHC. O estudo experimental de Osei-Hyiaman *et al* (2005) revelou um aumento da activação do receptor CB1 no fígado e no hipotálamo de ratos obesos com esteatose hepática. De modo semelhante Gary-Bobo *et al* (2007) desenvolveu um estudo experimental onde demonstrou que a administração de um antagonista do receptor CB1 em ratos obesos

geneticamente manipulados previne o desenvolvimento de esteatose e melhora alguns parâmetros da Síndrome Metabólica. Mais recentemente, o estudo de Deveaux *et al* (2007) mostrou que o receptor CB2 também está associado à promoção da esteatose devido a um aumento da resposta inflamatória no tecido adiposo.

Depois das evidências experimentais da contribuição do sistema endocanabinóide na esteatogénese hepática, Hézode *et al* (2008) realizou um estudo transversal com o objectivo de investigar o impacto do consumo recente de cannabis (menos de 6 meses) na severidade da esteatose em pacientes infectados pelo VHC não tratados. Concluiu que o consumo diário de cannabis está associado a esteatose severa em pacientes infectados pelo VHC, independentemente do genótipo, da actividade necroinflamatória, do IMC e da carga viral.

CONCLUSÃO

A hepatite C crónica é uma doença de incidência decrescente com taxas de mortalidade que têm aumentado ao longo do tempo (Wong *et al* – 2000) Estas evidências epidemiológicas podem ser explicadas, pelo menos em parte, pela diminuição da transmissão via transfusão sanguínea, pelo carácter arrastado de evolução da doença e pelo aparecimento de complicações hepáticas potencialmente fatais nos indivíduos infectados antes do rastreio de sangue para VHC. É, portanto, de suma importância que os clínicos estejam atentos à evolução da doença dos seus pacientes de modo a prevenirem ou atrasarem o aparecimento de complicações. Para além da inclusão em programas terapêuticos anti-virais, os médicos podem e devem alterar o curso da infecção pelo VHC diminuindo o risco da sua progressão. É actuando sobretudo ao nível dos factores de risco ambientais que uma intervenção não medicamentosa é possível.

Está bem documentado que o álcool está associado à progressão da hepatite C crónica e a uma alteração da resposta terapêutica. Adicionalmente, dados recentes sugerem que não há um nível máximo de ingestão alcoólica que permita assegurar a ausência de risco e a abstinência deve ser sempre recomendada. Os médicos devem estar cientes destes factos e oferecer aos pacientes alcoólicos suporte apropriado, nomeadamente a inclusão em programas de desintoxicação. Da mesma forma, devem ser feitos esforços na tentativa de rastrear a hepatite C de uma forma mais agressiva entre os consumidores de álcool. Apoio psicológico, tratamento das patologias psiquiátricas associadas à dependência alcoólica e assistência social são medidas adicionais que deverão ser tomadas em casos mais específicos.

Os efeitos deletérios do tabaco no risco de progressão da hepatite C não estão tão bem esclarecidos. A preocupação com a hepatotoxicidade do tabaco emergiu recentemente, sendo que os estudos realizados neste âmbito são escassos e na sua maioria retrospectivos. Todos os doentes infectados pelo VHC deverão ser incentivados a deixar de fumar e deverá ser-lhes explicado que, apesar de ainda não ser claro o efeito negativo do tabaco no risco de progressão da doença, evidências epidemiológicas

apontam para uma possível e forte associação. No entanto, estudos prospectivos e trabalhos experimentais deverão ser realizados para esclarecer a relação causa-efeito e para suportar as evidências epidemiológicas.

O consumo de cannabis tem emergido como um potente co-factor no risco de progressão da hepatite C crónica, potenciando a esteatose e acelerando a fibrose. O acompanhamento de pacientes infectados pelo VHC deve incluir a recolha da história de possível consumo rotineiro de cannabis e os médicos devem sempre incentivar o seu abandono. Um achado importante dos estudos sobre cannabis e sistema endocanabinóide foi a identificação das propriedades antifibrogénicas dos antagonistas dos receptores CB1. Estas substâncias são já utilizadas no tratamento do excesso de peso e complicações cardiovasculares associadas devido ao antagonismo que exercem no hipotálamo, inibindo o apetite. No entanto, estudos adicionais deverão ser realizados na tentativa de identificar aplicações terapêuticas destes novos fármacos em pacientes com hepatite C crónica.

BIBLIOGRAFIA

- Agarwal R (2005) Smoking, oxidative stress and inflammation: impact on resting energy expenditure in diabetic nephropathy. *BMC Nephrol* 6:13.
- Aloman C, Gehring S, Wintermeyer P, Kuzushita N, Wands JR (2007) Chronic ethanol consumption impairs cellular immune responses against VHC NS5 protein due to dendritic cell dysfunction. *Gastroenterology* 132:698–708.
- Anand BS, Currie S, Dieperink E, Bini EJ, Shen H, Ho SB, Wright T (2006) Alcohol use and treatment of hepatitis C virus: results of a national multicenter study. *Gastroenterology* 130:1607–1616.
- Batkai S, Jarai Z, Wagner JA, Goparaju SK, Varga K, Liu J (2001) Endocannabinoids acting at vascular CB1 receptors mediate the vasodilated state in advanced liver cirrhosis. *Nat Med* 7:827–832.
- Batkai S, Jarai Z, Wagner JA, Goparaju SK, Varga K, Liu J, Wang L, Mirshai F, Khanolkar AD, Makryannis A, Urbascheck R, Garcia N Jr, Sanyal AJ, Kunos G (2001) Endocannabinoids acting at vascular CB1 receptors mediate the vasodilated state in advanced liver cirrhosis. *Nat Med* 7:827–832.
- Campbell JV, Hagan H, Latka MH, Garfein RS, Golub ET, Coady MH (2006) High prevalence of alcohol use among hepatitis C virus antibody positive injection drug users in three US cities. *Drug Alcohol Depend* 81:259–265.
- Corrao G, Aricò S (1998) Independent and combined action of hepatitis C virus infection and alcohol consumption on the risk of symptomatic liver cirrhosis. *Hepatology* 27:914–919.
- Dev A, Patel K, Conrad A, Blatt LM, McHutchison JG (2006) Relationship of smoking and fibrosis in patients with chronic hepatitis C. *Clin Gastroenterol Hepatol* 4:797–801.
- Deveau V, Ichitogani Y, Teixeira-Clerc F, Manin S, Tran-Van Nhieu J, Karsak M (2007) CB2 receptor antagonism reduces diet induced obesity, insulin resistance and hepatic steatosis. *Hepatology* 46:308A.
- Di Marzo V, Bifulco M, De Petrocellis L (2004) The endocannabinoid system and its therapeutic exploitation. *Nat Rev Drug Discov* 3:771–784.
- Fernandez-Rodriguez CM, Romero J, Petros TJ, Bradshaw H, Gasalla JM, Gutierrez ML (2004) Circulating endogenous cannabinoid anandamide and portal, systemic and renal hemodynamics in cirrhosis. *Liver Int* 24:477–483.
- Fujita Y, Shibata A, Ogimoto I, Kurozawa Y, Nose T, Yoshimura T, Suzuki H, Sakata R, Ichikawa S, Tamakoshi A (2006) The effect of interaction between hepatitis C virus and cigarette smoking on the risk of hepatocellular carcinoma. *Br J Cancer* 94:737–739.
- Gary-Bobo M, Elachouri G, Gallas JF, Janiak P, Marini P, Ravinet-Trillou C (2007) Rimonabant reduces obesity-associated hepatic steatosis and features of metabolic syndrome in obese Zucker fa/fa rats. *Hepatology* 46:122–129.
- Harris DR, Gonin R, Alter HJ, Wright EC, Buskell ZJ, Hollinger FB, Seeff LB (2001) The relationship of acute transfusion-associated hepatitis to the development of cirrhosis in the presence of alcohol abuse. *Ann Intern Med* 134:120–124.
- Harris HE, Ramsay ME, Andrews N, Eldrige KP (2002) Clinical course of hepatitis C virus during the first decade of infection: *cohort* study. *BMJ* 324:450–453.
- Hezode C, Lonjon I, Roudot-Thoraval F, Mavrier JP, Pawlotsky JM, Zafrani ES (2003) Impact of smoking on histological liver lesions in chronic hepatitis C. *Gut* 52:126–129.
- Hezode C, Lonjon I, Roudot-Thoraval F, Pawlotsky JM, Zafrani ES, Dhumeaux D (2003) Impact of moderate alcohol consumption on histological activity and fibrosis in patients with chronic hepatitis C, and specific influence of steatosis: a prospective study. *Aliment Pharmacol Ther* 17:1031–1037.

- Hezode C, Roudot-Thoraval F, Nguyen S, Grenard P, Julien B, Zafrani ES, Pawlostky JM, Dhumeaux D, Lotersztajn S, Mallat A (2005) Daily cannabis smoking as a risk factor for progression of fibrosis in chronic hepatitis C. *Hepatology* 42:63–71.
- Hezode C, Zafrani ES, Roudot-Thoraval F, Costentin C, Hessami A, Bouvier-Alias M, Medkour F, Pawlostky JM, Lotersztajn S, Mallat A (2008) Daily cannabis use, a novel risk factor of steatosis severity in patients with chronic hepatitis C. *Gastroenterology* 134:432–439.
- Ishida JH, Jin C, Bacchetti P, Tan V, Peters M, Terrault A (2008) Influence of cannabis use on severity of hepatitis C disease. *Clin Gastroenterol Hepatol* 6:69–75.
- Julien B, Grenard P, Teixeira-Clerc F, Van Nhieu JT, Li L, Karsak M, Zimmer A, Mallat A, Lotersztajn S (2005) Antifibrogenic role of the cannabinoid receptor CB2 in the liver. *Gastroenterology* 128:742–755.
- Kasper, Braunwartz, Fauci, Hauser, Longo, Jameson (2006) *Harrison Medicina Interna*. 16ª ed. Mc Graw Hill. Rio de Janeiro.
- Kim WR, Gross Jr JB, Poterucha JJ, Locke III GR, Dickson ER (2001) Outcome of hospital care of liver disease associated with hepatitis C in the United States. *Hepatology* 33:201–206.
- Klatsky AL, Armstrong MA (1992) Alcohol, smoking, coffee, and cirrhosis. *Am J Epidemiol* 136:1248–1257.
- Lotersztajn S, Julien B, Teixeira-Clerc F, Grenard P, Mallat A (2005) Hepatic fibrosis: molecular mechanisms and drug targets. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 45:605–628.
- Monto A, Patel K, Bostrom A, Pianko S, Pockros P, McHutchison JG, Wright TL (2004) Risks of a range of alcohol intake on hepatitis C related fibrosis. *Hepatology* 39:826–834.
- Osei-Hyiaman D, Depetrillo M, Pacher P, Liu J, Radaeva S, Batkai S (2005) Endocannabinoid activation at hepatic CB(1) receptors stimulates fatty acid synthesis and contributes to diet induced obesity. *J Clin Invest* 115:1298–1305.
- Ostapowicz G, Watson KJ, Locarnini SA, Desmond PV (1998) Role of alcohol in the progression of liver disease caused by hepatitis C virus infection. *Hepatology* 27:1730–1735.
- Perlemuter G, Letteron P, Carnot F, Zavala F, Pessayre D, Nalpas B, Bréchet C (2003) Alcohol and hepatitis C virus core protein additively increase lipid peroxidation and synergistically trigger hepatic cytokine expression in a transgenic mouse model. *J Hepatol* 39:1020–1027.
- Pessione F, Ramond MJ, Njapoum C, Duchatelle V, Degott C, Erlinger S, Rueff B, Valla DC, Degos F (2001) Cigarette smoking and hepatic lesions in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology* 34:121–125.
- Piasecki BA, Lewis JD, Reddy KR, Bellamy SL, Porter SB, Weinrieb RM (2004) Influence of alcohol use, race and viral coinfections on spontaneous VHC clearance in a US veteran population. *Hepatology* 40:892–899.
- Polynard T, Bedossa P, Opolon P (1997) Natural history of liver fibrosis progression in patients with chronic hepatitis C. *Lancet* 349:825–832.
- Rigamonti C, Mottaran E, Reale E, Rolla R, Cipriani V, Capelli F, Boldorini R, Vidali M, Sartori M, Albano E (2003) Moderate alcohol consumption increases oxidative stress in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology* 38:42–49.
- Rosman AS, Waraich A, Galvin K, Casiano J, Paronetto F, Liber CS (1996) Alcoholism is associated with hepatitis C but not hepatitis B in an urban population. *Am J Gastroenterol* 91:498–505.
- Roudot-Thoraval F, Bastie A, Pawlostky JM, Dhumeaux D (1997) Epidemiological factors affecting the severity of hepatitis C virus-related liver disease: a French survey of 6664 patients. The study group for the prevalence and the epidemiology of hepatitis C virus. *Hepatology* 26:485–490.
- Teixeira-Clerc F, Julien B, Grenard P, Tran Van Nhieu J, Deveaux V, Li L, Serreere-Lanneau V, Ledent C, Mallat A, Lotersztajn S (2006) CB1 cannabinoid receptor antagonism: a new strategy for the treatment of liver fibrosis. *Nat Med* 12:671–676.
- Tierney LM, McPhee SJ, Papadakis MA (2006) Fígado, vias biliares e pâncreas. In: *CURRENT Medicina Diagnóstico e Tratamento* (Mc Graw Hill, 45ª edição), pp 605–651. Rio de Janeiro.

- Tsui JI, Pletcher MJ, Vittinghoff E, Seal K, Gonzales R (2006) Hepatitis C and hospital outcomes in patients admitted with alcohol related problems. *J Hepatol* 44:262-266.
- Westin J, Lagging LM, Spak F, Aires N, Svensson E, Lindh M, Dhillon AP, Norkrans G, Wejstal R (2002) Moderate alcohol intake increases fibrosis progression in untreated patients with hepatitis C virus infection. *J Viral Hepat* 9:235–241.
- Wong JB, McQuilan GM, McHutchison JG, Polinard T (2000) Estimating future hepatitis C morbidity, mortality, and costs in the United States. *Am J Public Health* 90:1562-1569.
- Yang SR, Chida AS, Bauter MR, Shafiq N, Seweryniak K, Maggirwar SB, Kilty I, Rahman I (2006) Cigarette smoke induces proinflammatory cytokine release by activation of NF-kappaB and posttranslational modifications of histone deacetylase in macrophages. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 291:L46–L57.
- Yu MW, Hsu FC, Sheen IS, Chu CM, Lin DY, Chen CJ (1997) Prospective study of hepatocellular carcinoma and liver cirrhosis in asymptomatic chronic hepatitis B virus carriers. *Am J Epidemiol* 145:1039–1047.
- Zarsky JP, McHutchison J, Bronowicki JP, Sturm N, Garcia-Kennedy R, Hodaj E (2003) Rate of natural disease progression in patients with chronic hepatitis C. *J Hepatol* 38:307-314.
- Zein CO, Beatty K, Post AB, Logan L, Debanne S, McCullough AJ (2006) Smoking and increased severity of hepatic fibrosis in primary biliary cirrhosis: a cross validated retrospective assessment. *Hepatology* 44:1564–1571.
- Zhang T, Li Y, Lai JP, Douglas SD, Metzger DS, O'Brien CP (2003) Alcohol potentiates hepatitis C virus replicon expression. *Hepatology* 38:57–65.