

CLÁUDIA MARIA FERREIRA DA SILVA

DETERMINAÇÃO DA RAZÃO
HIDROXIMETRONIDAZOL/METRONIDAZOL NO
PLASMA DE PACIENTES COM DOENÇA HEPÁTICA
POR ÁLCOOL E POR HEPATITE C

*Dissertação de Mestrado apresentada ao
Curso de Pós-Graduação em Farmacologia
da Faculdade de Ciências Médicas da
Universidade Estadual de Campinas, para
obtenção do título de mestre em Ciências na
área de Farmacologia.*

Orientador: PROF. DR. JOSÉ PEDRAZZOLI JÚNIOR

Campinas

1997



UNIDADE	BC
N.º GLO. 2001	
Unicamp	
338d	
V.	
33555	
395/98	
	X
PL	R\$ 11,00
DATA	17/04/98
N.º GLO	

CM-00109373-6

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
UNICAMP**

Si38d

Silva, Cláudia Maria Ferreira da

Determinação da razão hidroximetronidazol/metronidazol no plasma de pacientes com doença hepática por álcool e por hepatite C / Cláudia Maria Ferreira da Silva. Campinas, SP : [s.n.], 1997.

Orientador : José Pedrazzoli Júnior

Tese (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.

I. Cirrose hepática. 2. Testes funcionais hepáticos. 3. Hepatite. I. José Pedrazzoli Júnior. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. José Pedrazzoli Júnior, pela orientação, paciência e confiança, que tornou este trabalho possível.

Ao Prof. Dr. Marcelo Muscará e aos amigos Flávia e Eryck pela colaboração e apoio incondicional.

Aos amigos e funcionários do Departamento de Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, em especial à Gislaine, pelo acolhimento e simpatia.

À Eliana, Fátima, Simone e às minhas irmãs Tereza e Julie que pela compreensão e fé me encorajaram desde o início deste projeto.

À FAPESP pelo apoio financeiro recebido mediante a concessão da bolsa de mestrado.

Ao IPPEX pelo apoio financeiro para o Projeto de Pesquisa.

*“Confia ao Senhor as tuas obras,
e terão bom êxito os teus projetos.”*

Prov. XVI, 3.

SUMÁRIO

	pág.
Resumo	i
1. Introdução	1
1.1 Doença hepática por álcool	2
1.1.1 Deficiência nutricional.....	3
1.1.2 Fatores imunológicos, citocinas e associação com infecção viral	4
1.1.3 Sexo, idade e fatores genéticos.....	6
1.1.4 Toxicidade do etanol.....	7
1.2 Doença hepática por hepatite C	13
1.3 Citocromo P450	17
1.4 O metronidazol.....	20
1.5 Testes quantitativos de avaliação da função hepática	23
2. Objetivos	26
3. Materiais e métodos	28
3.1 Seleção de pacientes e de voluntários.....	29
3.2 Protocolo clínico	31
3.3 Equipamentos.....	32
3.4 Reagentes e soluções.....	33

SUMÁRIO

3.5 Preparação das soluções estoque 33

3.6 Preparação da curva de calibração..... 34

3.7 Condições cromatográficas..... 34

3.8 Análise das concentrações plasmáticas de metronidazol
e hidroximetronidazol 34

3.9 Análise estatística..... 35

4. Resultados 36

4.1 Doença hepática por álcool..... 37

4.2 Doença hepática por hepatite C 42

5. Discussão..... 47

6. Summary 53

7. Referências Bibliográficas..... 55

8. Apêndice 88

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Testes bioquímicos de função e lesão hepática dos grupos de indivíduos com doença hepática alcoólica e grupo controle..... 38

Tabela 2. Testes bioquímicos de função e lesão hepática dos portadores assintomáticos do vírus da hepatite C, hepatite C crônica e grupo controle..... 43

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Curva das concentrações plasmáticas de metronidazol em relação ao tempo, para os grupos controle, hepatite alcoólica e cirrose hepática por álcool..... 39

Figura 2. Curva das concentrações plasmáticas de hidroximetronidazol em relação ao tempo, para os grupos controle, hepatite alcoólica e cirrose hepática por álcool..... 40

Figura 3. Curva da razão plasmática hidroximetronidazol/metronidazol em relação ao tempo, para os grupos controle, hepatite alcoólica e cirrose hepática por álcool..... 41

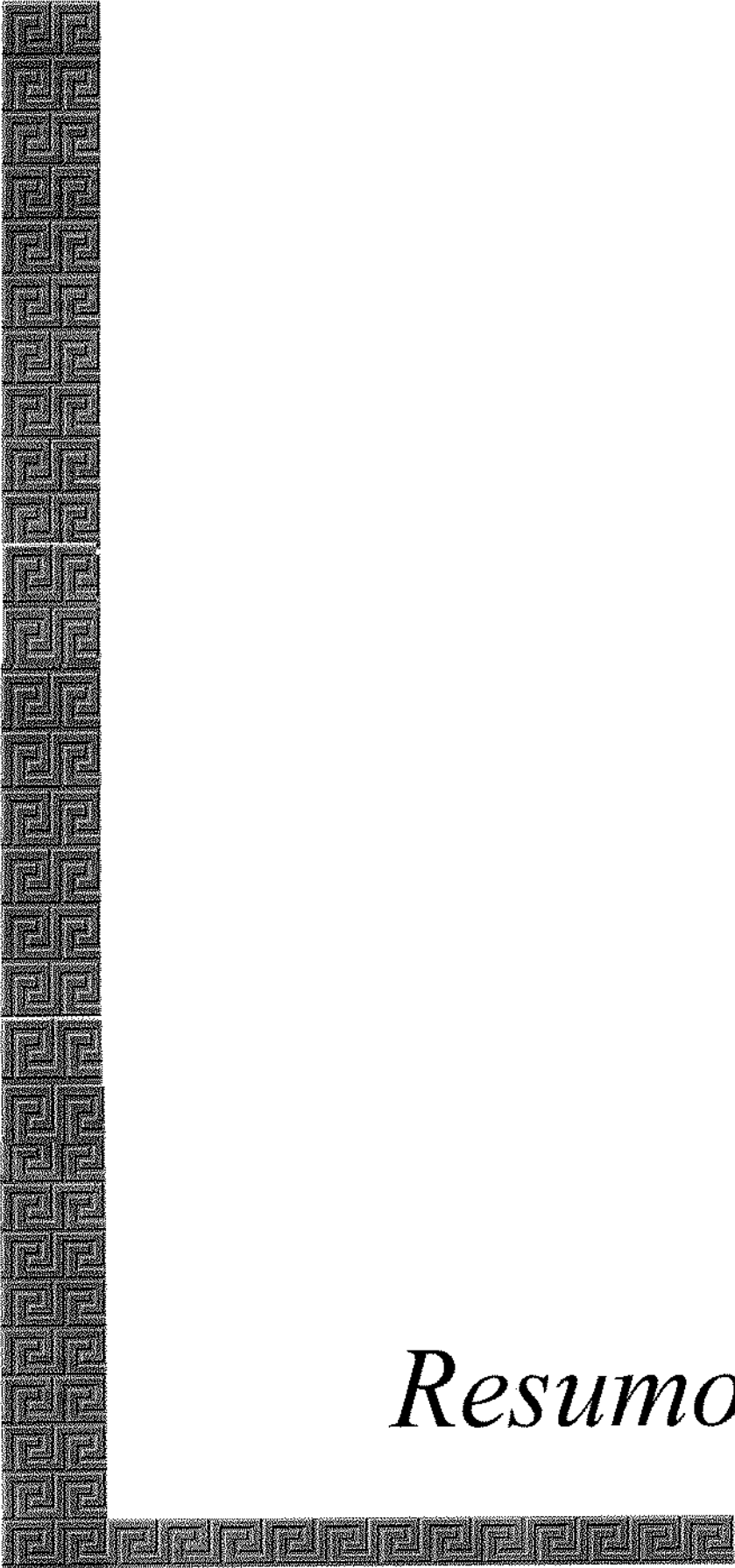
Figura 4. Curva das concentrações plasmáticas de metronidazol em relação ao tempo, para os grupos controle, portadores assintomáticos do vírus da hepatite C e hepatite C crônica..... 44

Figura 5. Curva das concentrações plasmáticas de hidroximetronidazol em relação ao tempo, para os grupos controle, portadores assintomáticos do vírus da hepatite C e hepatite C crônica..... 45

Figura 6. Curva da razão plasmática hidroximetronidazol/metronidazol em relação ao tempo, para os grupos controle, portadores assintomáticos do vírus da hepatite C e hepatite C crônica..... 46

LISTA DE ABREVIACÕES

ADH	Álcool desidrogenase
AgHBs	Antígeno de superfície do vírus da hepatite B
ALDH	Aldeído desidrogenase
ALT	Alanino aminotransferase
anti-HCV	Anticorpo contra o vírus da hepatite C
AST	Aspartato aminotransferase
CYP	Citocromo P450
γGT	Gama glutamil transpeptidase
HCV	Vírus da hepatite C
HPLC	Cromatografia líquida da alta eficiência
IL	Interleucina
INF	Interferon
MEOS	Sistema microsomal de oxidação do etanol
MET	Metronidazol
OHM	Hidroximetronidazol
OHM/MET	Razão hidroximetronidazol/metronidazol
TGF	Fator de transformação e crescimento
TNF	Fator de necrose tumoral
UV	Ultra violeta



Resumo



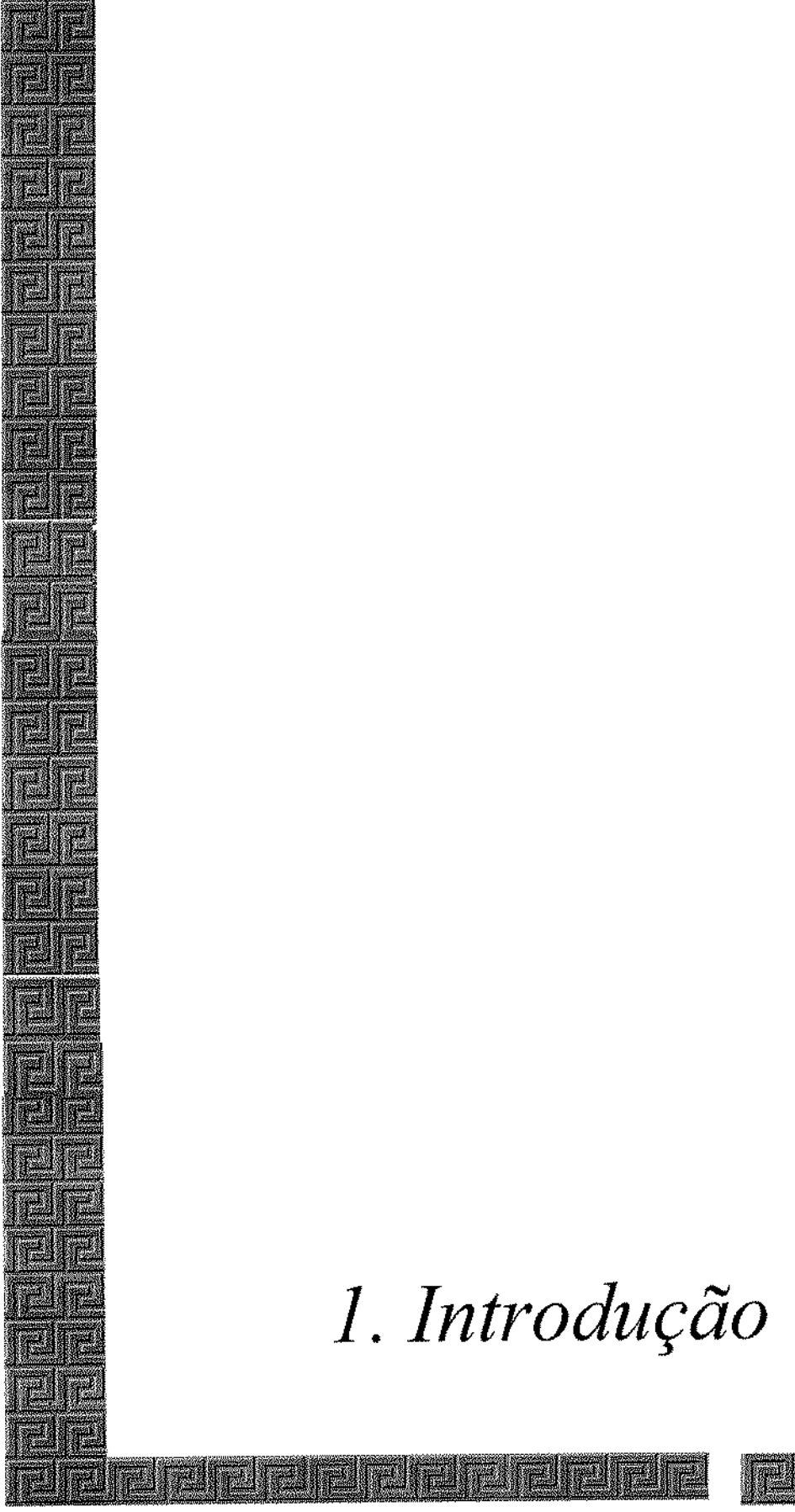
Elevações dos níveis séricos de transaminases (AST e ALT) não refletem a gravidade da doença hepática, e a bilirrubina sérica, albumina e tempo de protrombina podem estar normais nos indivíduos que ainda não desenvolveram, ou apresentam-se em estágios iniciais de cirrose.

Testes dinâmicos de função hepática como *clearance* de verde de indocianina, bromosulfaleína, lidocaína, galactose, têm sido utilizados para complementar os testes bioquímicos convencionais. Contudo, estes testes não se alteram na presença de lesões histológicas mínimas.

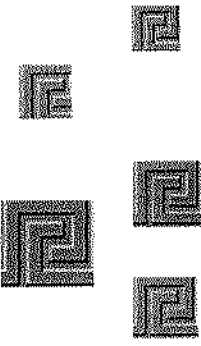
Neste trabalho, foi avaliada a razão plasmática hidroximetronidazol/metronidazol em indivíduos com: cirrose hepática alcoólica, classificados de acordo com Child-Pugh nos graus A (n = 9), B (n = 9) e C (n = 8), hepatite alcoólica (n = 23), hepatite C crônica (n = 13), portadores assintomáticos de hepatite C (n = 14), que foram comparados a um grupo controle (n = 12).

As concentrações plasmáticas foram medidas por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) de fase reversa com detecção por absorção ultra violeta. Para a análise estatística foram utilizados os métodos de análise de variância (ANOVA) e o teste de Student-Newman-Keuls para múltiplas comparações.

A razão hidroximetronidazol/metronidazol demonstrou, de modo significativo, a redução da capacidade dos portadores de doença hepática de metabolizar o metronidazol após sua administração endovenosa, quando comparada à dos indivíduos sadios. Este fenômeno foi observado nas amostras colhidas dos diversos grupos, logo aos dez minutos após o término da infusão de metronidazol (voluntários sadios $0,078 \pm 0,005$; hepatite alcoólica $0,045 \pm 0,008$, $p < 0,01$; cirrose hepática: Child-Pugh A $0,022 \pm 0,005$, $p < 0,001$, B $0,032 \pm 0,008$, $p < 0,01$, C $0,013 \pm 0,004$, $p < 0,001$; portador assintomático de hepatite C $0,043 \pm 0,005$, $p < 0,001$; hepatite C crônica $0,034 \pm 0,003$, $p < 0,001$).



1. Introdução



1.1 Doença hepática por álcool

A cirrose hepática é uma das principais causas de morte em muitos países do mundo (SHERLOCK, 1993); nos Estados Unidos é a 9ª causa de morte mais freqüente, sendo a 6ª entre os homens na faixa etária de 35 a 54 anos (BORING et al., 1993). Estima-se que o álcool seja o agente responsável em cerca de 41% a 95% dos casos de morte por cirrose hepática (VAN THIEL et al., 1981).

O prognóstico da cirrose hepática relaciona-se com o quadro clínico e com a reserva funcional hepática, tendo sido observada uma sobrevida de cinco anos ou mais em 90% dos casos de cirrose alcoólica na ausência de ascite, icterícia, hemorragias do trato gastro intestinal, ou quando o paciente abstem-se do uso de álcool (POWELL et al., 1968). Por outro lado, a expectativa de vida pode cair a zero se houver a adição de encefalopatia hepática (SAUNDERS et al., 1981). A probabilidade de sobrevivência por 1 e 5 anos após o primeiro episódio de ascite tem sido estimada em 50% e 20% respectivamente (GINES et al., 1989). Entre os cirróticos com ascite, pacientes com insuficiência renal têm sobrevida menor (GINES et al., 1989).

Muitos pacientes etilistas procuram tratamento somente após intensa pressão familiar ou em decorrência de problemas legais ou profissionais, enquanto que outros, somente após um quadro de descompensação da doença hepática. Uma possível estratégia da Saúde Pública para as doenças do fígado provocadas por álcool seria identificar os pacientes com alto risco de desenvolver a cirrose e suas complicações, interrompendo, assim, a progressão da doença (LIEBER, 1993). Muitos estudos mostram que a intervenção médica precoce pode ser efetiva em promover a abstinência (WALLACE et al., 1988; WALSH et al., 1991; ROSMAN & HIELER, 1994). Devido ao fato de que a identificação destes pacientes não é

satisfatória, torna-se necessário o desenvolvimento de testes para a caracterização dos mesmos, baseados na patogênese das doenças do fígado provocados pelo álcool (ROSMAN et al., 1994).

A predisposição ao desenvolvimento da cirrose alcoólica ainda tem sua origem desconhecida (SHERLOCK & DOOLEY, 1992), embora alguns fatores pareçam contribuir para o desenvolvimento da lesão hepática em indivíduos susceptíveis (LEEVI, 1993). Dentre eles, parecem ter importância, a própria toxicidade do etanol, a deficiência nutricional, a idade, o sexo, os fatores genéticos, os fatores imunológicos, a associação com infecções virais e a ação de citocinas (LIEBER, 1994).

1.1.1 Deficiência nutricional

O álcool é rico em energia (7,1 Kcal/g) e, por isto, uma grande ingestão de álcool pode causar decréscimo da ingestão de alimentos. A má digestão e a má absorção de nutrientes são complicações gastrointestinais associadas ao alcoolismo, em decorrência do envolvimento do pâncreas e do intestino delgado (LIEBER, 1994).

Por muitas décadas, a deficiência da colina foi incriminada como o principal fator etiológico na patogênese da lesão hepática (LIEBER, 1994). Contudo, a suplementação da colina não impediu a produção da esteatose hepática em voluntários sadios (RUBIN et al., 1968). Em humanos, a deficiência da colina tem sido documentada somente em circunstâncias de restrição extrema deste elemento na dieta (CHAWLA et al., 1989).

A deficiência de metionina também tem sido considerada como um importante fator na patogênese da lesão hepática associada ao álcool (SHAW et al., 1981). Contudo, o excesso da metionina mostrou ocasionar efeitos adversos

(FINKELSTEIN et al., 1986), incluindo o decréscimo de adenosina trifosfato (ATP) no fígado (HOROWITZ et al., 1981). Em primatas, o consumo do etanol leva a um decréscimo nos níveis de fosfolípidos e fosfatidilcolina, podendo ambos ser corrigidos com suplementação de fosfatidilcolina (LIEBER et al., 1994). Alterações nos fosfolípidos que compõem a membrana mitocondrial podem ser responsáveis pelo decréscimo da atividade da citocromo oxidase, além de produzirem outras alterações bioquímicas e morfológicas (ARAI et al., 1984). O mecanismo pelo qual o consumo do etanol altera os níveis de fosfolípidos não está claro, tendo sido relatado um decréscimo da atividade da fosfolípide metiltransferase na cirrose (DUCE et al., 1988). Outro mecanismo, pelo qual o etanol altera os níveis de fosfolípidos, é pela formação de fosfatidiletanol (HOEK et al., 1992). A administração de preparações ricas em fosfatidilcolina poliinsaturada (LIEBER et al., 1990), ou virtualmente pura (LIEBER et al., 1994), parece prevenir a fibrose e a cirrose induzidas pelo álcool, em primatas.

Fatores dietéticos contribuem para o dano hepático em etilistas, mas isto não pode ser considerado um argumento contra a natureza hepatotóxica do álcool (LIEBER, 1994).

1.1.2 Fatores imunológicos, citocinas e associação com infecção viral.

Dentre as alterações imunológicas associadas à doença hepática pelo álcool, podemos citar a depressão da atividade das células T, o aumento da atividade dos macrófagos e formação de complexos aldeído-proteínas (LE & VILCEK, 1987). Estes podem agir como neoantígenos, resultando numa resposta imune e no aumento sérico de citocinas, como o fator de necrose tumoral (TNF α) e interleucinas (LE & VILCEK, 1987).

A interleucina 1 (IL-1) e o TNF α são duas citocinas comumente expressas durante a inflamação, a sepsis e a malignidade. São consideradas como sendo pró-inflamatórias, podendo estar envolvidas na produção dos efeitos agudos do álcool e nas fases iniciais das doenças crônicas do fígado provocadas pelo mesmo, devido a um dano tissular direto ou devido ao aumento da fibrogênese (LE & VILCEK, 1987). Os níveis séricos de interleucina 6 (IL-6) correlacionam-se com os parâmetros bioquímicos indicativos de lesão hepática em pacientes etilistas crônicos com doença hepática. Após um episódio de hepatite alcoólica aguda, os níveis de IL-6 normalizam-se rapidamente, enquanto que os níveis de TNF α e IL-1 permanecem elevados por meses (KHORUTS et al., 1991). Níveis elevados de IL-8 têm sido demonstrados na hepatite alcoólica (HILL et al., 1992). Isto pode sugerir a participação da IL-8, a partir de estimulação neutrofílica que ocorre no dano hepático por álcool (RODRÍGUEZ et al., 1995).

Mudanças dos níveis séricos de citocinas durante a evolução clínica da hepatite alcoólica podem ter um importante valor prognóstico e quanto maior e mais grave a resposta imune, maior a mortalidade (RODRÍGUEZ et al., 1995). O TGF β 1 (fator de crescimento e transformação β 1) inibe a proliferação do hepatócito e parece ter um papel importante na estimulação da fibrogênese pelas células de Ito, produtoras de componentes da matriz extracelular (WEINER et al., 1992). O TGF β 1 é também um importante modulador da ação de outras citocinas, atuando como um imunossupressor (SHULL et al., 1992). O mecanismo pelo qual o etanol estimula a síntese de TGF β 1 ainda não foi bem estabelecido (CASTILLA et al., 1991).

Em muitos indivíduos com cirrose alcoólica não há evidências de antecedentes de hepatite viral, mas o alcoolismo e as hepatites B e C estão comumente associados (PARES et al., 1990). Em muitos etilistas, a inflamação

portal e/ou lobular está fortemente associado com o anticorpo anti-HCV, mesmo na ausência de fatores de risco para esta infecção (ROSMAN et al., 1993).

1.1.3 Sexo, idade e fatores genéticos

A dose de álcool capaz de promover o desenvolvimento da cirrose hepática é, em média menor em mulheres (20g/dia), do que a observada em homens (40-60g/dia) (PEQUIGNOT et al., 1978). Diferenças no metabolismo do álcool em relação ao sexo têm sido descritas tanto para o metabolismo hepático, quanto para o gástrico (ARTHUR et al., 1984; COLE-HARDING & WILSON, 1987; MISHA et al., 1989). Tem sido observado diminuição da velocidade de eliminação, redução da área sobre a curva da concentração sérica de álcool e aumento na velocidade de eliminação durante o período intermenstrual, associado com o aumento dos níveis de progesterona, da relação progesterona/estradiol e de decréscimo do nível de hormônio folículo estimulante (SUTKER et al., 1987). A resposta hormonal ao etanol, no que diz respeito à prolactina e ao cortisol, também parece ser diferente em ambos os sexos (SCHUCKIT et al., 1987; LEX, 1991).

Experimentalmente, foi observado um decréscimo linear na velocidade de metabolização do etanol com o avanço da idade, associado com um decréscimo da atividade da ADH (HAHN & BURCH, 1983). No entanto, este achado não foi confirmado em humanos (VESTAL et al., 1976). As mulheres tem também menor atividade do ADH gástrico do que os homens (FREZZA et al., 1990), pelo menos antes dos 50 anos (SEITZ et al., 1993). O consumo prolongado de etanol está associado com o aumento do citocromo P450 4A1 em ratos do sexo feminino, o que parece ser menos evidente no sexo masculino (MA et al., 1993).

A variação interindividual na susceptibilidade dos efeitos do álcool sobre o fígado tem sua explicação, também, baseada num suporte genético. Estima-se que

entre três etilistas tem um dos genitores etilista e o risco de se tornar etilista é de 15% comparado com 8%, quando os genitores são abstêmios (CRABB, 1994). Esta associação mostra que, tanto fatores ambientais quanto genéticos são importantes na gênese desta condição. Muitas diferenças bioquímicas têm sido identificadas entre etilistas, sendo que a mais significativa delas é a variação nos genes que codificam as enzimas que metabolizam o álcool, respectivamente a álcool- e a aldeído desidrogenase (ADH e ALDH) (CRABB, 1994).

1.1.4 Toxicidade do etanol

O hepatócito contém três vias de metabolização do etanol, cada uma localizada num compartimento subcelular diferente: a via ADH no citoplasma (fração solúvel da célula), o sistema microsomal de oxidação do etanol (MEOS), localizado no retículo endoplasmático e a catalase, localizada no peroxissomo (LIEBER, 1994). As três vias resultam na produção de acetaldeído, um metabólito altamente tóxico (LIEBER, 1994). A principal via de metabolização do etanol é a via ADH. Em condições normais, cerca de 10% do álcool é metabolizado via MEOS, mas esta via é induzida pelo uso crônico de altas doses de etanol e pode ser responsável por grande parte da metabolização em etilistas crônicos (ACHORD et al., 1993). A via MEOS refere-se, especificamente ao CYP 2E1 (LIEBER, 1990), o qual é induzido pelo álcool. Foi demonstrada não só uma alta concentração de CYP 2E1 na região centro lobular no fígado de ratos, mas também uma indução seletiva do mesmo nesta região pelo etanol. Isto pode explicar a seletividade do dano provocado pelo etanol nesta região (INGELMAN-SUNDBERG et al., 1988).

O aumento do MEOS com a ingestão crônica de etanol parece ser adaptativo e pode levar a sérios efeitos adversos para o fígado. A indução do citocromo P450

pelo etanol pode contribuir para a formação de radicais tóxicos, explicando o aumento da vulnerabilidade de etilistas a solventes industriais como tetracloreto de carbono (LIEBER, 1990) e a analgésicos como acetaminofen (MADDREY, 1987). A ativação do MEOS pode, também, explicar a susceptibilidade de etilistas crônicos a neoplasias, o que se daria por meio da ativação de carcinogênicos (LIEBER, 1990).

Muitos distúrbios funcionais e estruturais do hepatócito, associados com a ingestão de etanol, podem ser resultado tanto do efeito direto, como do indireto do acetaldeído (LIEBER, 1988; TUMA et al., 1991). O aumento do acetaldeído em etilistas crônicos reflete, provavelmente, tanto o aumento da produção, quanto a diminuição do seu metabolismo pelo fígado (LIEBER, 1984). Acredita-se que o aumento da produção resulte da ativação do MEOS enquanto que o decréscimo do metabolismo do acetaldeído reflete a diminuição da atividade do ALDH da mitocôndria (LIEBER, 1990). Contudo, ainda é discutido se o decréscimo do metabolismo resulta de uma supressão do ALDH mitocondrial, induzido pelo etanol, ou se é secundário ao dano hepático (JENKINS et al., 1984; PALMER & JENKINS, 1985; WANG et al., 1990). Existe uma evidência direta que o aumento da produção do acetaldeído, associado com a ingestão crônica de etanol, pode alterar a função mitocondrial e inibir a atividade da ALDH. Isto leva também, a um aumento nos níveis do acetaldeído, resultando este círculo vicioso em necrose do hepatócito (WANG et al., 1989).

Além dos efeitos do acetaldeído na mitocôndria, outros efeitos adversos sobre a função hepática tem sido descritos (LIEBER, 1988). Estes incluem as alterações na reparação do DNA e de microtúbulos o que resulta na alteração da secreção e do transporte de proteínas (SOWELL & TUMA, 1987). Tem sido demonstrado que o acetaldeído aumenta a peroxidação lipídica, a síntese de colágeno, gera neoantígenos e se liga a proteínas do hepatócito (LIEBER, 1988). Enquanto que alguns destes efeitos ocorrem por ação direta do acetaldeído, a

formação de complexos de proteínas com o acetaldeído e os efeitos destes sobre a estrutura e função do hepatócito tem recebido considerável atenção como um possível mecanismo de lesão hepática (LIEBER, 1988). Muitos estudos tem demonstrado a presença de anticorpos contra estes complexos no soro e no fígado de indivíduos com vários graus de doença hepática (WORRALL et al., 1990; NIEMELA et al., 1991; TUMA et al., 1991).

Além disto, considerável atenção tem sido dada à interação entre a tubulina e o acetaldeído, bem como aos seus efeitos na função do microtúbulo (TUMA et al., 1991) e na polimerização da tubulina para formar microtúbulos (TUMA et al., 1991).

O acetaldeído reduz a secreção de proteínas, podendo resultar em edema do hepatócito e em alterações estruturais e funcionais dos mesmos, isto seria um fator que poderia contribuir para a necrose (TUMA et al., 1991).

Além de ligar-se a tubulina e à actina (SOWELL & TUMA, 1987), o acetaldeído pode formar complexos com o citocromo P450 2E1 (BEHRENS et al., 1988; LUCAS et al., 1990), com a calmodulina (JENNET et al., 1989), com a RNase (MAUCH et al., 1987), com o pró colágeno tipo I (TUMA et al., 1991) e com a glicose 6 fosfato desidrogenase (MAUCH et al., 1985).

Alguns estudos indicam que o acetato, produto da oxidação do acetaldeído, é capaz de afetar a lipogênese, a cetogênese e a gliconeogênese, produzindo esteatose hepática (LIEBER, 1984).

Durante a oxidação do etanol, o NADH é gerado como resultado da transferência de hidrogênio para o NAD^+ . O potencial *redox* alterado, indicado pelo aumento da média NADH/NAD^+ , pode produzir mudanças no fluxo e no metabolismo de vários substratos (LIEBER, 1980), como por exemplo, os lipídeos, os carboidratos, as proteínas e o ácido úrico. Estas alterações produzidas pelo *redox* tem sido associadas ao desenvolvimento de acidose láctica, de cetose e de hiperuricemia (KREISBERG et al., 1971; LIEBER, 1980; LIEBER, 1984);

contudo, com a ingestão crônica de etanol, estas alterações parecem atenuar-se, sendo isto mediado, possivelmente, pelo sistema MEOS (LIEBER, 1984).

O etanol leva a profundas anormalidades no metabolismo lipídico, o que pode ter um papel no desenvolvimento da esteatose hepática (GOLDBERG et al., 1989). Isto deve-se, em parte, ao fato de que o etanol é o principal combustível para o fígado, diminuindo a oxidação lipídica (SHELMET et al., 1988). O potencial *redox* alterado aumenta o α glicerofosfato, o que favorece o aumento de triglicerídeos. O etanol aumenta, também, a velocidade de formação de triglicerídeos, estimulando enzimas envolvidas em sua síntese, e altera o metabolismo do colesterol. A proliferação do retículo endoplasmático, sítio da sua síntese, pode explicar o aumento visto na ingestão crônica de etanol (LIEBER, 1984).

Os efeitos do etanol sobre o metabolismo proteico incluem o aumento de síntese, o decréscimo na degradação e na secreção, o que provoca acúmulo de proteínas, resultando clinicamente em hepatomegalia (MATSUDA et al., 1991; DONAHUE et al., 1991).

A deposição de colágeno no espaço de Disse e ao redor dos hepatócitos é um importante achado morfológico associado ao desenvolvimento da fibrose hepática induzida pelo álcool (LIEBER, 1984). As células de Ito são responsáveis pelo aumento da síntese de colágeno associado ao desenvolvimento da fibrose hepática induzida pelo etanol (TSUKAMOTO et al., 1990). A síntese de colágeno pelas células de Ito requer que as mesmas sejam ativadas (FRIEDMAN, 1990; SHIRATOTI, 1986). Possivelmente, a formação de complexos com o acetaldeído é necessária para a estimulação da síntese de colágeno (CASINI et al., 1991).

Considerável interesse tem sido dado ao papel das citocinas, como moduladores da ativação das células de Ito e da síntese de colágeno (WEINER et al., 1990; MATSUOKA & TSUKAMOTO, 1990). Por exemplo, o TGF β 1 aumenta o RNAm pró-colágeno e o conteúdo do mesmo nas células de Ito ativadas

(WEINER, 1990). Outras citocinas, como a interleucina 1e o fator de necrose tumoral α , estimulam a proliferação das células de Ito (FRIEDMAN, 1990). Outros fatores importantes na indução da síntese do colágeno ou na sua ativação, na doença alcoólica, incluem os fatores imunológicos (SCHNABEL et al., 1991), a hipóxia hepática induzida pelo etanol (FRIEDMAN, 1990), a deficiência nutricional (RAYSSIGUIER, 1985) e as alterações na matriz pericelular (FRIEDMAN, 1990).

Acredita-se que a peroxidação induzida pelo etanol resulte tanto no aumento da produção de radicais livres quanto em alterações no mecanismo antioxidante (SHAW & JAYATILLETE, 1992). Os mecanismos propostos para a geração de radicais livres durante o metabolismo do etanol envolvem a participação do citocromo P450 2E1, da NADPH P450 redutase (REINKE et al., 1990), da cadeia respiratória (KAMIMURA et al., 1992), da xantina oxidase (KATO et al., 1990), e da aldeído oxidase (SHAW & JAYATILLETE, 1990; SHAW & JAYATILLETE, 1992).

Assim como outras funções hepáticas essenciais, a regeneração hepática é, também, alterada pelo etanol, o que contribui para o desenvolvimento da doença hepática alcoólica (DIEHL et al., 1990) por mecanismos desconhecidos (FAUSTO ET AL., 1989; MICHALPOULOUSS, 1991).

O espectro patológico da lesão hepática provocada pelo álcool inclui a esteatose hepática, a hepatite alcoólica e a cirrose, que podem coexistir em um mesmo paciente (WOODS et al., 1993).

O reconhecimento e o tratamento da hepatite alcoólica, uma lesão potencialmente reversível, é um importante aspecto da doença hepática alcoólica (ACHORD, 1993).

Os sinais e sintomas da hepatite alcoólica podem variar desde leves até a descompensação hepática (icterícia, ascite, hipertensão portal e encefalopatia hepática). As alterações laboratoriais desta condição incluem a leucocitose, e em

alguns casos, leucopenia, anemia, alargamento do tempo de protrombina e elevação das enzimas hepáticas, incluindo AST (aspartato aminotransferase), ALT (alanino aminotransferase), fosfatase alcalina e bilirrubinas. A razão AST/ALT superior a 2,0 é comum em pacientes com hepatite alcoólica (WOODS, 1993). O diagnóstico histológico da hepatite alcoólica requer três achados essenciais: lesão do hepatócito, infiltrado inflamatório e fibrose. Corpúsculos de Mallory, agregados eosinofílicos de material proteináceo denso de localização peri nuclear, são freqüentemente encontrados nestas células (TAKAHASKI et al., 1987). A deposição de tecido fibroso ocorre, inicialmente, ao redor da veia centrolobular e a obliteração das mesmas pode ocorrer quando a fibrose é intensa, podendo levar a hipertensão portal pós sinusoidal e ascite, antes do desenvolvimento da cirrose (CAULET et al., 1989).

A cirrose hepática caracteriza-se por dano generalizado, com formação de nódulos de regeneração e de fibrose, o que a distorção da arquitetura hepática. Secundárias a estas alterações anatômicas, existem as alterações funcionais e os distúrbios hemodinâmicos (GREENWEL et al., 1994). Em geral, o paciente procura assistência médica em consequência dos sintomas e sinais de descompensação. Achados laboratoriais comuns incluem o aumento dos níveis séricos das bilirrubinas, da gamaglobulina, da fosfatase alcalina e das transaminases, albumina reduzida, anemia normocrômica e normocítica leve, ou, às vezes, do tipo macrocítico, leucócitos e plaquetas reduzidos devido ao hiperesplenismo e tempo de protrombina prolongado (ROSMAN & HIELER, 1994).

1.2 Doença hepática por hepatite C

A hepatite C, anteriormente classificada no grupo das “não-A, não-B” (MISHIRO et al., 1990), é causada por um vírus (HCV) pequeno (30 - 38 nm de diâmetro), pertencente a família *Flaviviridae*, contendo uma molécula de RNA de cadeia simples no seu núcleo e um envelope lipídico. O genoma do HCV possui uma larga região de 9.300 a 9.500 nucleotídeos que codifica as informações genéticas para replicação viral. Esta região codifica, também, poliproteínas que posteriormente sofrem clivagem. O produto de clivagem das poliproteínas estruturais constitui o *core* e o envelope, enquanto que a clivagem das poliproteínas não estruturais produz as enzimas protease, helicase e RNAase (RNA polimerase).

O genoma do HCV possui regiões mutáveis (NS2, E1 e E2), outras relativamente estáveis (C, NS3, NS4 e NS5) e duas regiões terminais, 5' e 3'. Alguns segmentos estruturais e não estruturais podem desencadear a produção de anticorpos. Dentre os antígenos já descritos encontram-se o c22-3 (antígeno estrutural, cuja codificação se situa no genoma próximo à extremidade 5' terminal), o c33-c (antígeno não estrutural) e o c100-3 (antígeno não estrutural). Muitas vezes, os antígenos c33c e c100-3 são considerados conjuntamente e recebem a denominação de c200 (BROWN, 1995).

O HCV pode ser classificado em diversos genótipos com base nas variações da sequência de nucleotídeos (OGATA et al., 1991). Ao menos seis diferentes genótipos são distinguidos (1 - 6), sendo que cada um compreende vários subtipos (a, b, c, etc...) (SIMMONDS et al., 1993). A distribuição dos genótipos do HCV varia de país para país. Na Europa e nos Estados Unidos, os subtipos HCV 1a, 1b, 2a, 2b e 3a são abundantes, enquanto que no Japão os subtipos 1a e 3a são virtualmente inexistentes. O genótipo 4 é comum no norte da África e os

tipos 5 e 6 têm sido identificados em amostras obtidas no sul da África e em Hong Kong respectivamente (DUSHEIKO ET AL., 1994). A associação entre genótipos/subtipos do HCV e níveis de viremia, com características demográficas, bioquímicas, histológicas e os dados da evolução clínica de pacientes com infecção crônica é conflitante (SILINI et al., 1995).

A hepatite C possui, como característica marcante, a alta frequência de evolução para a doença crônica após a infecção aguda, o que atinge em média, 50% a 62% dos casos (ALTER et al., 1992; KORETZ et al., 1993). Dos indivíduos com infecção aguda, 40% possuem história de exposição parenteral (transfusão de derivados de sangue, uso de drogas injetáveis, hemodiálise, acidentes perfurantes com agulha), sendo o meio de transmissão sexual controverso (KAUR et al., 1996). A hepatite C crônica, mesmo que assintomática em seu curso clínico, evolui para cirrose em aproximadamente 20% dos pacientes após 10 anos (DI BISCEGLIE et al., 1991; KIYOSAWA et al., 1990) e para carcinoma hepatocelular (HCC) em 3% dos casos (COLOMBO et al., 1991).

Mecanismos diretos relacionados à citopatogenicidade do HCV (YUKI et al., 1993) e indiretos, relacionados à resposta imune celular (SCHEUER et al., 1992), são aceitos como as principais causas de lesão, seguida de morte hepatocelular. Isto precipita outra seqüência de eventos inflamatórios capazes de, pela falta de resolução ou desequilíbrio (definidos entre fenômenos citotóxicos agressivos e fatores inibitórios contedores do processo), aumentar o tempo de doença que caracteriza sua cronificação.

Os linfócitos T citotóxicos $CD8^+$ (CLT) são células envolvidas na imunopatogenicidade induzida pelo HCV, atuando contra as proteínas virais expressas na superfície das células alvo (hepatócitos), o que resulta em lise das mesmas. Contudo, sua resposta é dependente das células T $CD4^+$, conhecidas como linfócitos T *helper*, as quais possuem papel fundamental na indução da resposta anti-viral. A heterogenicidade nos clones de células T $CD4^+$, é

reconhecida pelos diferentes padrões de citocinas produzidos, ou seja, TH1, produtores de interferon gama (IFN gama) e interleucina 2 (IL-2), e clones TH2, produtores de IL-4, IL-10 e IL-13, envolvidas na resposta humoral. Embora não seja completamente conhecido como a resposta inflamatória define-se por determinado clone, há forte indício de que o fenômeno ocorra durante a apresentação do antígeno. A experiência demonstra que a resposta TH1 é o paradigma da resposta imune celular eficaz, com produção predominante de interferon gama, reforçando a função bactericida dos macrófagos; do mesmo modo as citocinas com poder antiviral e citotóxico tipo TNF alfa, são produzidas em grande quantidade. A resposta TH2 poderá apresentar-se no decorrer do processo infeccioso, à medida que a doença se estenda para a cronicidade, produzindo uma resposta imune celular menos eficaz, com produção de citocinas consideradas atualmente antagônicas ao FNT alfa e ao IFN gama, como por exemplo, IL-4 e IL-10 (BATTEGAY, 1996; CACCIARELLI et al., 1996).

A resposta inflamatória implica na produção de outras citocinas imunossupressoras, entre as quais destacase a TGF β . Seu predomínio na resposta inflamatória desviará o equilíbrio inflamatório para o lado não regenerativo, agravando a perda de hepatócitos, que é, por outro lado, seguida pelo aumento da resposta das células de Ito e miofibroblastos (SANDERSON et al., 1995).

O escape imune é uma teoria atrativa que explica o alto grau de seqüência variável do envelope e a infecção naturalmente persistente do HCV, através das mudanças nos genes E1 e E2. A alteração na antigenicidade do vírus permitiria um escape aos anticorpos neutralizantes. Neste modelo, a replicação viral continua é uma competição entre a diversificação do HCV e o esforço do sistema imune do hospedeiro em responder a estas mudanças (WEINER et al., 1992).

A citólise, que ocorre no curso do processo inflamatório, expõe a face citoplasmática da membrana do retículo endoplasmático, que contém o citocromo P450. Parece possível que linfócitos ativados, de maneira ainda desconhecida,

reconheçam o citocromo P450 e que este mecanismo imunológico tenha participação na progressão da doença (WAXMAN et al., 1988). A metade dos casos de hepatite crônica com a presença de anticorpos anti microssomal contra fígado e rins (anti-LKM1 - marcador da hepatite autoimune tipo 2), são associados à presença da infecção pelo HCV (FUSCONI et al., 1990) e o processo de autoimunidade pode ser consequência da infecção viral. Recentemente, foi demonstrado que o anti-LKM1 direciona-se contra o CYP 2D6 (LUNEL et al., 1992). Na infecção pelo HCV encontra-se, também, o anti-GOR, um auto-anticorpo, que reflete a autoimunidade induzida pelo HCV (MICHAEL et al., 1992). Por outro lado, anticorpos anti-HCV tem sido encontrados na doença hepática autoimune (FUSCONI et al., 1990). Anticorpos anti-GOR e anti-LKM1 contribuem para melhor diferenciar as hepatites crônicas, um achado que pode ter implicações terapêuticas (MICHEL et al., 1992).

As alterações histopatológicas na hepatite C incluem as lesões necroinflamatórias, às vezes com formação de folículos linfóides e de fibrose perivenular e pericelular (BEDOSSA et al., 1996). O “período de latência” da hepatite C, antes da descompensação cirrótica, é de, pelo menos, 10 anos e a maioria dos indivíduos são assintomáticos, ou possuem sintomas inespecíficos neste período (KORETZ et al., 1993).

Entre os métodos utilizados para a pesquisa do HCV temos o de ELISA (ensaio imunoenzimático), o RIBA (ensaio de *imunoblotting* recombinante) e o PCR (reação em cadeia da polimerase). O primeiro antígeno que foi utilizado para a pesquisa do anti-HCV, por técnica imunoenzimática (c100-3), apresentava 20% de sensibilidade e cerca de 50% de especificidade. Com este ensaio, verificavam-se reações falso-positivas em algumas situações, como nas hepatites autoimunes, na doença hepática alcoólica, nas doenças reumáticas ou nas paraproteinemias. Nos testes de segunda geração foram acrescentados o c22c e o c33c, tornando o

teste mais sensível (50 a 90%) e específico (80%). O método RIBA, utilizando vários antígenos, estruturais e não estruturais do HCV, eleva a especificidade do teste a níveis superiores a de 90%. O PCR é o teste que permite a identificação do RNA do HCV, após amplificação, com sensibilidade acima de 90% e especificidade de 100% (BRADLEY, 1992; BROWN, 1995).

Considerável controvérsia existe com relação ao estado de portador sadio (PRIETO et al., 1995). Foram encontradas alterações histológicas em doadores de sangue anti-HCV positivos, com HCV RNA presente no soro e com níveis normais de ALT, sugerindo a inexistência do estado de portador sadio (TANAKA et al., 1991). A resolução das anormalidades bioquímicas pode não evidenciar a resolução da doença (YOUSUF et al., 1992), e são indicadores pouco sensíveis da severidade da lesão histológica (DI BISCEGLIE et al., 1991).

O fato de que a hepatite C é a forma mais comum de doença hepática em muitos países e possuir evolução, na maioria das vezes, silenciosa, torna-se necessário, a existência de um teste para caracterizar os indivíduos de risco para o desenvolvimento de doença hepática crônica (KAUR et al., 1996).

1.3 Citocromo P450

Os citocromos P450 constituem uma família de hemoproteínas, localizadas na membrana do retículo endoplasmático (COLIN et al., 1992). São classificados, com base na seqüência homóloga de aminoácidos, em famílias (designadas por números arábicos ex: CYP 1, CYP 2...) e subfamílias (designadas por letras maiúsculas ex: CYP 2A, CYP 2B...). Membros de diferentes famílias do citocromo têm menos de 35% de semelhança entre as seqüências de aminoácidos, porém aqueles de diferentes subfamílias possuem entre 35% a 65% de semelhança. Componentes individuais de uma subfamília têm mais de 65% de semelhança e

são designadas por números arábicos (ex: CYP 2A1, CYP 2A2...) (NERBERT et al., 1991).

Os citocromos P450 são enzimas envolvidas no metabolismo oxidativo de esteróides, ácidos graxos, prostaglandinas, leucotrienos, aminas biogênicas (compostos endógenos), drogas e carcinogênicos químicos (compostos exógenos). Representam a clássica “fase I” do metabolismo, onde o substrato é oxigenado (NERBERT et al., 1987).

As reações de oxidação requerem a hemoproteína do citocromo P450, a NADPH citocromo P450 redutase, o NADPH e o oxigênio molecular (NERBERT et al., 1987). O substrato xenobiótico reage com a forma oxidada (Fe^{3+}) do citocromo P450 para formar um complexo enzima-substrato. A citocromo P450 redutase aceita um elétron do NADPH que, por sua vez, reduz o complexo oxidado citocromo P450-xenobiótico; este, por sua vez, reage com o oxigênio molecular e com um outro elétron do NADPH, doado através da mesma flavoproteína redutase para formar um oxigênio ativado. Nas etapas finais desta reação, um átomo de oxigênio é liberado como H_2O e outro é transferido para o substrato. As biotransformações oxidantes, catalisadas pelas monooxigenases do citocromo P450, incluem a hidroxilação da cadeia aromática bilateral, a N-oxidação, a sulfoxidação, a N-hidroxilação, a desaminação, a desalogenização e a dissulfuração. Inúmeras reações redutoras também são catalisadas por enzimas do citocromo P450, geralmente, em condições de baixa tensão de oxigênio (NERBERT et al., 1987).

No fígado humano, foram identificados ao menos 12 enzimas do sistema citocromo P450 (NERBERT et al., 1991), sendo que cada uma delas é codificada por um único gene (WATKINS, 1990). Cada enzima do citocromo P450 possui um único sítio de ligação com o substrato e um mesmo citocromo P450 pode metabolizar várias drogas. Isto pode gerar competição entre duas ou mais drogas para a oxidação pela mesma enzima, o que pode diminuir o metabolismo de um

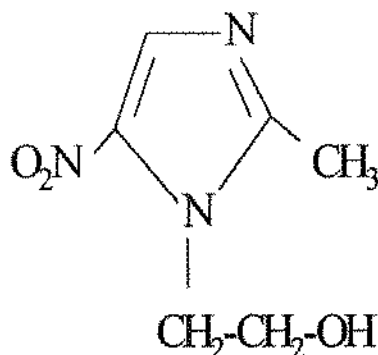
dos agentes (MURRAY, 1992). Os membros das famílias CYP 1, 2 e 3 são os predominantemente envolvidos com o metabolismo de drogas em humano, e sua expressão é modulada por hormônios, citocinas, fatores genéticos, bem como pode ser afetada por diferentes doenças (GEORGE et al., 1995).

O polimorfismo genético mais comum associado ao metabolismo oxidante de drogas é o da debrisoquina (MURRAY, 1992). A deficiência da atividade da debrisoquina oxidase reflete uma ou mais mutações no gene do CYP 2D6. Atualmente, sabe-se que números crescentes de agentes cardiovasculares, psicoativos e derivados da morfina são substratos do CYP 2D6 (MURRAY, 1992).

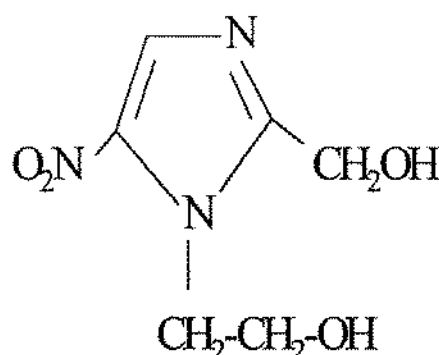
As enzimas do sistema citocromo P450 podem sofrer indução, determinando maior velocidade de biotransformação ou inibição, o que pode resultar em níveis elevados do fármaco original e maior incidência de toxicidade da droga. O etanol e a isoniazida induzem o CYP 2E1 (RYAN et al., 1986) e aumentam a toxicidade ao acetaminofen (MURPHY et al., 1990). A ciclosporina, a eritromicina e o cetoconazol competem pela ligação e metabolização pelo CYP 3A, sendo o mesmo induzido pela rifampicina e por esteróides (WATKINS, 1990). O omeprazol é também um agente que induz o CYP 1A (DIAZ et al., 1990). Estas interações entre drogas e o CYP podem ser relevantes para a biotransformação de procarcinogênios, de carcinogênios e de muitas drogas (HUMPHRIES, 1991).

Mecanismos imunológicos envolvendo o sistema citocromo P450 podem, também, estar relacionados com reações idiossincrásicas a drogas (BEAUNE et al., 1987) e com dano ao hepatócito (LOEPER et al., 1990).

1.4 O metronidazol



Metronidazol



Hidroximetronidazol

O metronidazol [1-(2-hidroxietil)-2-metil-5-nitroimidazol] é um derivado nitroimidazólico, introduzido na prática clínica, para o tratamento de infecções por *Trichomonas vaginalis* em 1959. É eficaz, também, no tratamento de outras infecções parasitárias, como as causadas por *Entamoeba histolytica* (POWELL et al., 1966) e por *Giardia lamblia* (KHAMBATTA, 1971). A atividade do metronidazol contra bactérias anaeróbias foi reconhecida em 1962 (SHINN, 1962), sendo que, dentre estas bactérias, os gêneros *Bacterioides*, *Clostridium* e *Helicobacter*, parecem ser particularmente sensíveis (JOHNSON, 1993).

O mecanismo de ação dos nitroimidazóis reflete-se na toxicidade seletiva aos microorganismos anaeróbios ou microaerófilos e para células anóxicas ou hipóxicas (DOCAMPO, 1990; JOHNSON, 1993). Logo que o fármaco se difunde nas células, o grupamento nitro aceita elétrons das proteínas de transporte de elétrons com potenciais redox negativos suficientemente baixos, como por exemplo, as flavoproteínas nas células mamíferas e as ferredoxinas, ou os respectivos equivalente nos protozoários e nas bactérias. No primeiro caso uma nitro redutase catalisa a reação do radical flavina com o composto nitro; no último

caso, a redução é catalisada pelos complexos ferro-enzofre. A fonte de elétrons para a redução pode ser um dos substratos reduzidos endógenos, como a dicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzido (NADPH) ou o sulfeto. A atividade antimicrobiana do metronidazol resulta, provavelmente da formação de intermediários lábeis, quimicamente reativos, formados durante a redução dos quatro elétrons do grupo nitro à hidroxilamina correspondente (DOCAMPO, 1990). A formação e o desaparecimento do ânion radical nitro, produto da redução de um elétron tanto pelos *Trichomonas* intactos como pelos extratos livres de células, foram bem demonstrados. Os passos moleculares pelos quais estes intermediários destroem as células não foram elucidados, mas, provavelmente, envolvem reações com macromoléculas celulares como o DNA, as proteínas e as membranas. Um trabalho inicial estabeleceu que o metronidazol inibe a síntese do DNA no *T. vaginalis* e no *Clostridium bifermentans* e provoca a degradação do DNA existente neste último microorganismo. Estudos subseqüentes com DNA de mamífero indicam que o metronidazol reduzido compromete a estrutura helicoidal do mesmo, com rompimento do filamento e comprometimento funcional. Estas descobertas são consistentes com os efeitos antimicrobianos e mutagênicos do metronidazol e com a sua capacidade de potencializar os efeitos da radiação nas células tumorais hipóxicas (DOCAMPO, 1990; JOHNSON, 1993). Entretanto, não existem evidências de que doses terapêuticas do metronidazol proporcionem qualquer aumento significativo de risco de câncer em pacientes humanos (LAU et al., 1992).

O metronidazol atinge concentração sérica máxima de 20 - 25 µg/ml, com dose de 7,5 mg/kg, quando administrados por via intravenosa. É absorvido em 80%, uma hora após a administração oral, sendo que o seu pico sérico, de aproximadamente 6,0 µg/ml, é obtido após uma dose oral de 250 mg (MC GILVARAY et al., 1978). O metronidazol é metabolizado no fígado pelo sistema citocromo P450 (LOFT et al., 1991), dando origem a dois metabólitos principais:

o hidroximetronidazol, que possui cerca de 65% da atividade farmacológica do metronidazol, e um derivado acético inativo (HALLER, 1982; O'KEEFE ET AL., 1982). A excreção dos metabólitos ocorre por via renal (60 a 80% do total da dose) e fecal (6 a 15% do total da dose). A glucuronidação e a excreção da droga *in natura* são vias de eliminação menos importantes (ROSENBLAT & RANDALL, 1987).

O metronidazol foi proposto para ser empregado em um teste funcional para o estudo do citocromo P450; porém, observou-se que diferentes citocromos são responsáveis pela sua metabolização e os específicos não foram ainda bem identificados (LOFT et al., 1991). Substratos de uma mesma enzima, atuando de maneira competitiva, ou inibidores específicos de citocromos P450 são utilizados para mapear os mesmos (BOOBIS & DAVIES, 1984). Antipirina, cimetidina, cafeína, teofilina, mefenitoína, tolbutamida, quinidina, acetona, nifedipina, não inibem ou inibem muito pouco a formação do hidroximetronidazol pelos microsossomos hepáticos (LOFT et al., 1991). O propranolol inibe a velocidade de hidroxilação em 70%, e a fenacetina inibe a hidroxilação do metronidazol de maneira competitiva, com isso conclui-se que os citocromos (CYP) 1A2, 2C9, 2C10, 2D6, 2E1 e 3A3 não contribuem significativamente para a hidroxilação do metronidazol em humanos (LOFT et al., 1991).

Recentemente, a farmacocinética do metronidazol foi estudada em pacientes com diversos graus de cirrose hepática e os resultados mostraram que seu metabolismo reduziu-se progressivamente com a piora da hepatopatia (MUSCARÁ et al., 1995).

1.5 Testes quantitativos para avaliação da função hepática

A determinação do *clearance* hepático de uma variedade de xenobióticos tem sido utilizado para avaliar o metabolismo de drogas, medir a perfusão hepática, determinar o prognóstico de diversas doenças do fígado, bem como verificar a resposta ao tratamento (JURG REICHEN, 1995).

A bromossulfaleína é um corante rapidamente removido da circulação pelo fígado e excretado na bile. Foi introduzido em 1924 e utilizado até por volta de 1970 para detectar disfunção hepática na ausência de icterícia, bem como para a determinação do fluxo sangüíneo hepático. Contudo, seu alto custo e seus efeitos colaterais limitaram a sua aplicabilidade (HACKI et al., 1976).

O verde de indocianina, é, também, um corante excretado inalterado na bile (CHERRICK et al., 1960). A determinação de seu *clearance* sistêmico tem sido utilizada há muitos anos como um teste de função hepática (BRODY & LEICHER, 1979). Devido à sua média de extração elevada, pode ser utilizado como um marcador de fluxo hepático (CAESAR et al., 1961). Sua extração média encontra-se diminuída em pacientes com cirrose hepática (SKAK & KEIDENG, 1987).

A determinação do *clearance* da antipirina (fenazona), introduzida como um teste farmacológico em 1950 (BRODIE & AXELROD, 1950), foi um dos primeiros testes utilizados por hepatologistas para quantificar a reserva funcional hepática na doença crônica do fígado (BRANCH et al., 1974; ANDREASEN et al., 1974). O metabolismo desta droga é complexo e sabe-se que diferentes enzimas do sistema citocromo P540 estão envolvidas, dentre elas CYP 1A2, CYP2C e CYP 3A (DANHOF et al., 1982). Tem sido demonstrado o valor prognóstico do teste da antipirina nas icterícias obstrutivas (NAZARETH et al., 1990) e na avaliação da capacidade de novas drogas em inibir ou induzir o sistema

de monoxigenases (DANHOF et al., 1982). Porém, esta característica constitui uma desvantagem para seu uso como prova de função hepática, visto que muitos compostos endógenos e xenobióticos alteram seu clearance (JURG REICHEN, 1995).

A aminopirina (aminofenazona), utilizada para estudo do metabolismo oxidativo hepático, era, inicialmente, administrada por via oral, mais tarde iniciou-se a administração endovenosa, e ultimamente, o teste respiratório tornou-se o mais freqüentemente utilizado; porém, assim como a fenazona, seu *clearance* reduz-se somente na doença hepática grave (MONROE et al., 1980).

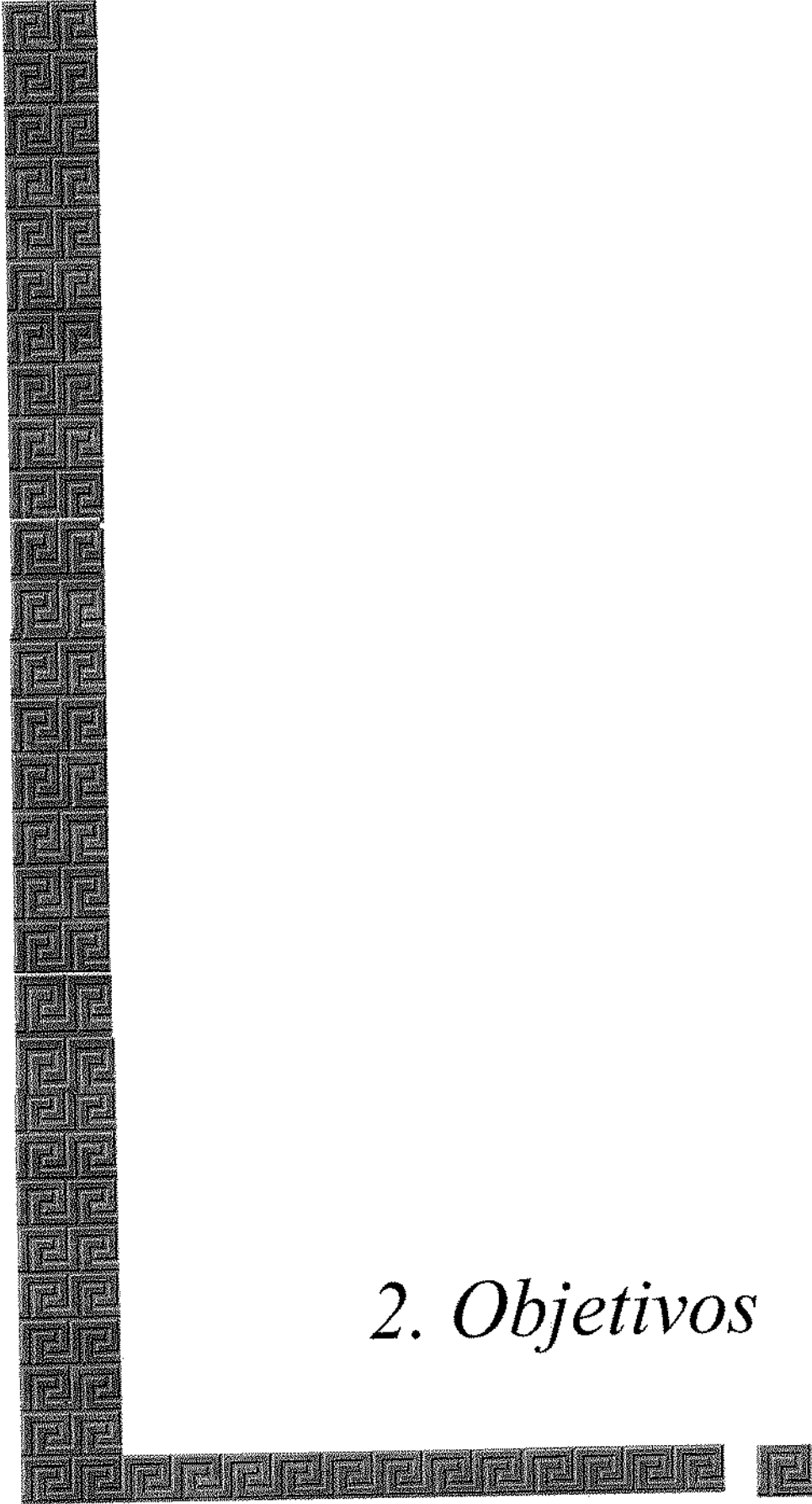
A determinação do clearance salivar (JOST et al., 1987), o teste respiratório (KOTAKE et al., 1982), ou a medida dos níveis em jejum (WAHLLAENDER et al., 1985) de cafeína, têm sido propostos para avaliar a capacidade de metabolização hepática de drogas. Teoricamente, as vantagens destas proposições incluem o fato de constituírem testes de baixo custo, não exibirem efeitos colaterais nas doses utilizadas, e de ser a cafeína completamente absorvida após a sua administração oral; porém seu uso é limitado pelo fato do *clearance* de cafeína encontrar-se induzido em tabagistas (KOTAKE et al., 1982), depender da dieta (JUAN et al., 1986) e exibir cinética dose dependente (CHENG et al., 1990). Apesar do *clearance* de cafeína encontrar-se diminuído na cirrose hepática (DESMOND et al., 1980), isto não diferencia pacientes com doença hepática não cirrótica de indivíduos sadios (RENNER et al., 1984). O metabolismo da cafeína envolve o CYP 1A1 (DESMOND et al., 1980).

O *clearance* de lidocaína, e mais recentemente, a formação do seu principal metabólito, a mono-etil-glicina-xilidida (MEGX) têm sido utilizados como testes quantitativos de função hepática (OELLERICH, et al. 1989). A redução em sua velocidade de extração não resulta somente de "*shunt porto sistêmico*", mas, também, de redução da atividade metabólica (COLLI et al., 1988). A enzima primariamente responsável por seu metabolismo é o CYP 3A4 (BARGETZI,

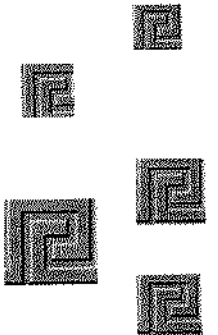
1989). O clearance desta substância encontra-se aumentado em tabagistas (HUET & LELORIER, 1980), relaciona-se com a idade em pacientes com doença hepática (PRITCHARD, 1994) e parece haver diferenças entre sexos, que se acentua-se com o uso de contraceptivos esteroidais (OELLERICH et al., 1994).

A galactose tem sido utilizada, há muitos anos, como marcador quantitativo da função hepática, estando relacionada à função citosólica (TYGSTRUP, 1963) e sendo utilizada na medida do fluxo sangüíneo hepático (HENDERSON et al., 1982). Este composto não se liga a proteínas plasmáticas, é metabolizado pelo fígado por fosforilação e tem seu acesso livre ao espaço de Disse (GORESKEY et al., 1973); contudo, a ocorrência de significativa eliminação extra hepática tem sido sugerida (KEIDING, 1988), e além disto, sua eliminação encontra-se prejudicada em indivíduos heterozigotos para galactosemia (SITZMANN et al., 1976), o que pode associar-se a resultados falso-positivos.

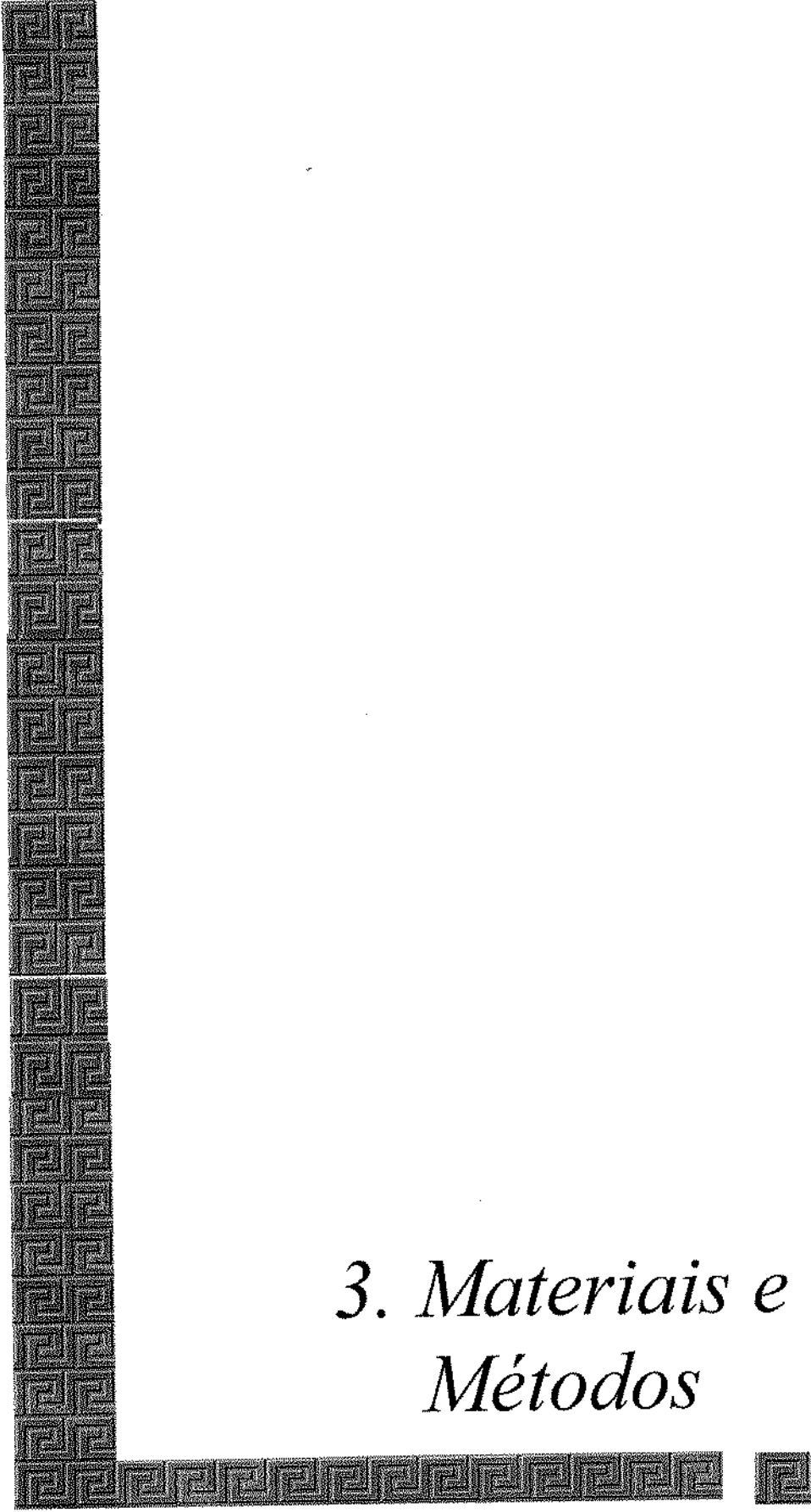
Elevações dos níveis séricos de AST e ALT não refletem a gravidade da doença hepática, e a bilirrubina sérica, albumina e tempo de protrombina podem estar normais nos indivíduos que ainda não desenvolveram, ou apresentam-se em estágios iniciais de cirrose hepática (SCHIFFMAN et al., 1994). Testes dinâmicos de função hepática têm sido utilizados para complementar os testes bioquímicos convencionais em pacientes com cirrose. Contudo, estes testes não se alteram na presença de lesões histológicas mínimas (SHIFFMAN et al., 1994). Por isso, há necessidade do desenvolvimento de um teste para a detecção precoce de indivíduos susceptíveis ao desenvolvimento ou agravamento da doença hepática, o que pode ter implicações, também, no que diz respeito à introdução precoce da terapêutica, visando diminuir a progressão da doença e das suas complicações.



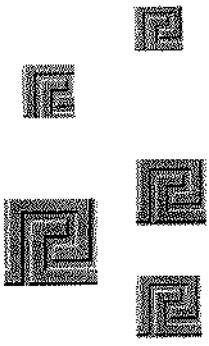
2. Objetivos



Avaliar a razão hidroximetronidazol/metronidazol no plasma de indivíduos com doença hepática associada ao álcool (hepatite alcoólica e cirrose hepática), e ao vírus da hepatite C (portadores assintomáticos e hepatite crônica), após administração venosa de dose única do metronidazol, fim de comparar o grau de disfunção hepática com o metabolismo da droga.



3. Materiais e Métodos



3.1 Seleção de pacientes e de voluntários

Pacientes e voluntários sadios assinaram um termo de esclarecimento e consentimento previamente ao estudo. O protocolo clínico foi aprovado pelo Comitê de Ética Médica do Hospital Universitário São Francisco. O estudo foi realizado de acordo com a Declaração de Helsinki.

Os indivíduos estudados, para serem classificados nos diversos grupos, foram submetidos a avaliação clínica, e a uma avaliação complementar que inclui: dosagem de glicemia, uréia, creatinina, transaminases (AST, ALT), fosfatase alcalina, gama GT, colinesterase, bilirrubinas totais, proteínas totais, albumina, ácido úrico, sódio, potássio, cloreto, hemoglobina, hematócrito, contagem total e diferencial de células brancas, velocidade de sedimentação eritrocitária, sorologias para hepatites B e C, exame de urina e protoparasitológico.

- Voluntários sadios - participaram do estudo, doze voluntários do sexo masculino, os quais eram estudantes e funcionários do Hospital Universitário São Francisco. Possuíam idade entre 19 e 48 anos (média $29,8 \pm 3,1$), peso corporal entre 60 e 96 Kg (média $74,6 \pm 3,7$), altura entre 160 e 180 cm (média $172,3 \pm 2,2$). Os mesmos não apresentavam história de etilismo nem sinais ou sintomas evidentes de doenças cardíaca, hepática, renal, pulmonar, neurológica, gastrointestinal, hematológica ou psiquiátrica, além do que, apresentavam os exames complementares dentro dos limites da normalidade.

- Pacientes com cirrose hepática por álcool - Participaram deste grupo, vinte e seis pacientes, os quais apresentavam história de etilismo crônico, testes sorológicos negativos para hepatites B e C, com quadro clínico, laboratorial e

ultrassonográfico compatível com o diagnóstico de cirrose hepática. Estes pacientes foram classificados de acordo com Child-Pugh (INFANTE-RIVARD et al., 1987) em: A - nove pacientes do sexo masculino com idade entre 35 e 64 anos (média $46,4 \pm 3,6$), peso corporal entre 50 e 87 Kg (média $68,5 \pm 3,9$), altura entre 152 e 171 cm (média $162,4 \pm 2,9$), B - nove pacientes do sexo masculino com idade entre 25 e 70 anos (média $45,5 \pm 6,1$), peso corporal entre 38,5 e 102 Kg (média $71 \pm 7,0$), altura entre 157 e 185cm (média $169,7 \pm 2,7$), C - oito pacientes do sexo masculino com idade entre 34 e 61 anos (média $48,6 \pm 3,6$), peso corporal entre 45 e 74,5 Kg (média $60,3 \pm 3,3$), altura entre 150 e 175 cm (média $166,4 \pm 1,8$).

- Pacientes com hepatite alcoólica - vinte e três pacientes do sexo masculino, com idade entre 18 e 64 anos (média = $40,5 \pm 2,4$), peso corporal entre 53 e 113 Kg (média = $67,6 \pm 3,1$), altura entre 155e 182 cm (média $168,1 \pm 1,5$) com testes sorológicos negativos para os vírus das hepatites B e C, com história de etilismo e alterações clínicas e laboratoriais compatíveis com o diagnóstico de hepatite alcoólica, estudados em quadro de abstinência ou de intoxicação, participaram deste grupo.

- Portadores assintomáticos do HCV - quatorze indivíduos do sexo masculino, com idade entre 18 e 76 anos (média $35,3 \pm 3,9$) e peso corporal entre 58 e 80 Kg (média $70,3 \pm 2,0$), altura entre 162 e 182 cm (média $170,6 \pm 1,6$) foram selecionados entre os doadores de sangue atendidos no Banco de Sangue da Universidade São Francisco (Hemocentro - HUSF), no período de 1993 a 1996 ou encaminhados de outros serviços para a Unidade de Gastroenterologia do nosso hospital. Eram indivíduos com testes sorológicos positivos para hepatite C, pelo método EIA de segunda geração (ABBOTT HCV EIA 2nd Generation, ABBOTT

Laboratories Diagnostics Division USA). Em todos os indivíduos com resultados positivos para hepatite C pelo método EIA, foi realizado o teste de aglutinação em partículas de gelatina, usando antígenos recombinantes C22-3 e C200 (Serodia-HCV, Fujirebio INC, Japan), como teste de confirmação diagnóstica. Foram considerados portadores assintomáticos os indivíduos, cujos testes laboratoriais indicativos de lesão hepática incluindo transaminases (AST, ALT), fosfatase alcalina e gama GT, estivessem normais em pelo menos três ocasiões diferentes com intervalos de um mês.

- Pacientes com hepatite C crônica - treze pacientes do sexo masculino, encaminhados de outros serviços para a Unidade de Gastroenterologia do nosso hospital, e que não haviam experimentado nenhum tipo de tratamento, foram incluídos neste grupo. Eram com idade entre 21 e 51 anos (média = $34,2 \pm 2,8$), peso corporal entre 54 e 105 Kg (média $79,6 \pm 4,8$), altura entre 163 e 184 cm (média $173,8 \pm 2,0$), sem história pregressa de alcoolismo, com testes sorológicos positivos para hepatite C (EIA segunda geração), sem infecção ativa pelo vírus da hepatite B (AgHBs negativo), com testes laboratoriais sugestivos de lesão hepática em atividade.

3.2 Protocolo clínico

O estudo consistiu na administração de uma dose única intravenosa de metronidazol (Flagyl - Rhodia, São Paulo, Brasil, 500mg em 100 ml), infundida durante 20 minutos.

Amostras de sangue (5 ml), foram coletadas imediatamente antes do início da infusão de metronidazol e aos tempos 5, 10, 20 e 30 minutos após o término da administração do mesmo, através de cateter tipo “*butterfly*” heparinizado,

colocado em veia antecubital. As amostras foram colocadas em tubos contendo EDTA como anticoagulante, e centrifugadas a 2000g durante 5 minutos, o plasma de cada amostra foi separado e guardado a -20°C, até ser analisado.

Todas as amostras pertencentes a um mesmo indivíduo foram analisadas num mesmo dia, para evitar variações inter-ensaio.

Os participantes permaneceram na Unidade de Farmacologia Clínica, como pacientes externos, durante a administração do metronidazol e a coleta das amostras de sangue.

3.3 Equipamentos

Para as análises cromatográficas foi utilizado um cromatógrafo líquido de alta eficiência da marca SHIMADZU (KYOTO, JAPAN), composto de uma bomba modelo LC-10AD, um injetor manual RHEODYNE 7125 com uma alça dosadora de 20µl, acoplado a um detector espectrofotométrico ultra violeta variável modelo SPD-10A/10Ai e um registrador marca Linear, com três canais.

As amostras foram pesadas em uma balança analítica METTLER modelo AE 240 com precisão de 0,0001 mg.

Os solventes foram desgaseificados em um Ultra Som COLE-PALMER modelo 8852.

As filtrações dos solventes foram feitas em um sistema de filtração Millipore a vácuo.

Utilizou-se uma coluna analítica, Spherisorb ODS com 5µm de tamanho de partícula (4,6 x 250 mm) marca Sigma-Aldrich.

Para agitação das soluções usou-se um Vortex marca Thermolyne modelo Maxi mix II.

3.4 Reagentes e Soluções

Para o desenvolvimento deste trabalho todos os solventes utilizados foram de pureza analítica e grau HPLC, da OmniSolv[®] (Merck KGaA, Darmstadt).

O sulfato de zinco e o fosfato de potássio monobásico foram da marca Merck. e o hidróxido de sódio usado foi da marca Labsynt.

O Tinidazol usado foi Sigma Chemical CO e o Metronidazol e Hidroximetronidazol foram doados pela Farmacologia Clínica (UNICAMP-SP).

3.5 Preparação das soluções estoque

A solução de tinidazol (padrão interno 0,38 mg/ml) foi preparada dissolvendo-se o sal (38 mg) em 100 ml de metanol .

A solução de sulfato de zinco (0,6M), foi preparada a partir do sal (17,25 g) em 100 mL de água.

A solução de hidróxido de sódio (0,4M) foi preparada a partir da dissolução do sal (1,6g) em 100 ml de água.

A solução de metronidazol e hidroximetronidazol, foi preparada pela dissolução de metronidazol (70 mg) e hidroximetronidazol (17 mg) em 100 ml de água.

A fase móvel usada foi metanol:tampão K_2HPO_4 (fosfato de potássio) 0,05 M (15:85).

3.6 Preparação da curva de calibração

Cada ponto da curva de calibração do metronidazol e hidroximetronidazol foi obtido adicionando quantidades conhecidas das soluções estoque (1,0; 2,0; 5,0; 10,0 e 20,0 mg/ml) e (0,24; 0,48; 1,2; 2,4 e 4,8 mg/ml) respectivamente, em 200ml de plasma.

Posteriormente, foram adicionados a cada ponto da curva 50ml de Tinidazol e para desproteinização 20ml de NaOH (0.4 M) e 20ml de ZnSO₄ (0.6 M). A mistura foi agitada no vortex durante 15 seg. e centrifugada à 2000g por 5 minutos, 20ml do sobrenadante foi então injetado no cromatógrafo.

3.7 Condições cromatográficas

A fase móvel foi bombeada a um fluxo 1,8ml/min e os picos do metronidazol e hidroximetronidazol foram detectados em um $\lambda = 324\text{nm}$.

3.8 Análise das concentrações plasmáticas do metronidazol e hidroximetronidazol dos pacientes estudados.

Para o tratamento das amostras dos pacientes, as mesmas foram preparadas como nos padrões, descrito no item 3.6

As concentrações das amostras foram obtidas das alturas dos respectivos picos usando o método do padrão interno e derivadas a partir da equação da reta da curva padrão.

3.9 Análise estatística

Os resultados dos diferentes grupos foram expressos pela média, com dispersão expressa pelo erro padrão da média (SEM). Todas as variáveis foram analisadas pelo método estatístico de análise de variância seguidos pelo teste de Student-Newman-Keuls para múltiplas comparações. Os resultados foram considerados estatisticamente significativos quando se constatou um valor de p inferior a 0,05.

4. Resultados

4.1 Doença hepática por álcool

A tabela 1 mostra que a AST apresentou diferença estatisticamente significativa entre os grupos hepatite alcoólica ($77,7 \pm 10,6$ U.I./ml) e grupo controle ($20,3 \pm 3,0$ U.I./ml; $p < 0,01$), e com o grupo cirrose hepática Child-Pugh A ($27,8 \pm 5,1$ U.I./ml; $p < 0,05$); a ALT mostrou diferença entre os grupos hepatite alcoólica ($57,6 \pm 8,5$ U.I.) e controle ($19,6 \pm 2,4$; $p < 0,01$), com o grupo cirrose hepática Child-Pugh A ($23,9 \pm 6,4$; $p < 0,05$), e com Child-Pugh B ($28,4 \pm 3,2$; $p < 0,05$). A γ GT no grupo cirrose hepática Child-Pugh C ($44,5 \pm 10,2$ U.I./ml) apresentou diferença significativa com relação ao grupo hepatite alcoólica ($146,8 \pm 32,5$ U.I./ml; $p < 0,001$). Não houve diferença estatisticamente significativa quanto as bilirrubinas nos grupos hepatite alcoólica e cirrose hepática (Child-Pugh A, B, C), quando comparados ao grupo controle. O tempo de protrombina apresentou diferença significativa no grupo cirrose hepática Child-Pugh C ($27,9 \pm 6,4$ seg.) tanto em relação ao controle ($12,9 \pm 0,5$ seg.; $p < 0,01$), quanto em relação ao grupo hepatite alcoólica ($12,1 \pm 0,3$ seg.; $p < 0,001$).

A figura 1 mostra que não houve diferenças estatisticamente significativas quanto as concentrações plasmáticas de metronidazol entre os grupos controle, cirrose hepática (Child-Pugh A, B, C) e hepatite alcoólica. Por outro lado, as concentrações de hidroximetronidazol apresentaram-se significativamente reduzidas em todos os grupos estudados, quando comparados ao controle como mostra a figura 2).

A razão hidroximetronidazol/metronidazol (figura 3) demonstrou de modo significativo a redução da capacidade dos portadores de doença hepática em metabolizar o metronidazol após sua administração endovenosa, comparada a indivíduos sadios. Este fenômeno foi observado em amostras colhidas logo aos dez minutos após o término da infusão de metronidazol (voluntários sadios 0,078

$\pm 0,005$; hepatite alcoólica $0,045 \pm 0,008$, $p < 0,01$; cirrose hepática: Child-Pugh A $0,022 \pm 0,005$, $p < 0,001$, B $0,032 \pm 0,008$, $p < 0,01$, C $0,013 \pm 0,004$, $p < 0,001$).

Tabela 1

Resultados dos testes bioquímicos de função e lesão hepática dos grupos de indivíduos com hepatopatia alcoólica e controle.

	Controle	Child Pugh-A	Child Pugh-B	Child Pugh-C	Hepatite alcoólica
AST(U.L/ml)	20,3 $\pm$ 3,0	27.8 $\pm$ 5.1 [#]	43,4 $\pm$ 9,0	61,3 $\pm$ 21,6	77,7 $\pm$ 10,6 ^{**}
ALT (U.L/ml)	19,6 $\pm$ 2,4	25.9 $\pm$ 6.4 [#]	28,4 $\pm$ 3,2 [#]	35,6 $\pm$ 8,7	57,6 $\pm$ 9.5 ^{**}
γ -GT (U.L/ml)	23,9 $\pm$ 5,6	56,4 $\pm$ 9,3	61,98 $\pm$ 20,1	44,5 $\pm$ 10,2 ^{###}	146,8 $\pm$ 32,5
Bilirrubina Total (mg%)	0,9 $\pm$ 0,2	1.2 $\pm$ 0.2	2,2 $\pm$ 0,4	5,8 $\pm$ 1,6	3,9 $\pm$ 2,1
Tempo de protrombina (seg.)	12,9 $\pm$ 0,5	16.6 $\pm$ 1.6	14,6 $\pm$ 0,7	27,9 $\pm$ 6,4 ^{###} ^{**}	12,1 $\pm$ 0,3

*, **, ***: p < 0.05, 0.01 e 0.001, respectivamente, vs. grupo controle.

#, ##, ###: p < 0.05, 0.01 e 0.001, respectivamente, vs. grupo hepatite alcoólica.

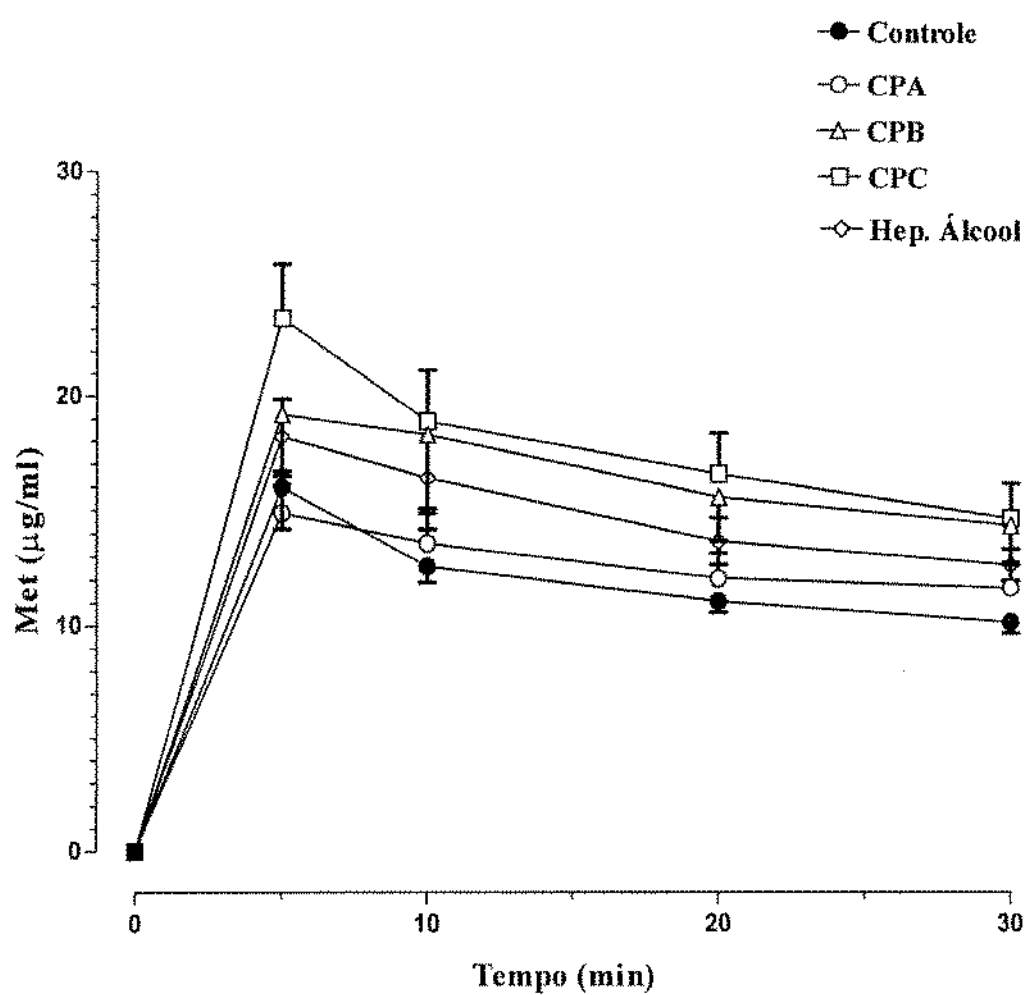


figura 1

Curva das concentrações plasmáticas de metronidazol (Met) em relação ao tempo, para os grupos controle, hepatite alcoólica, cirrose hepática por álcool, estes últimos foram classificados de acordo com Child-Pugh em A (CPA), B (CPB) e C (CPC).

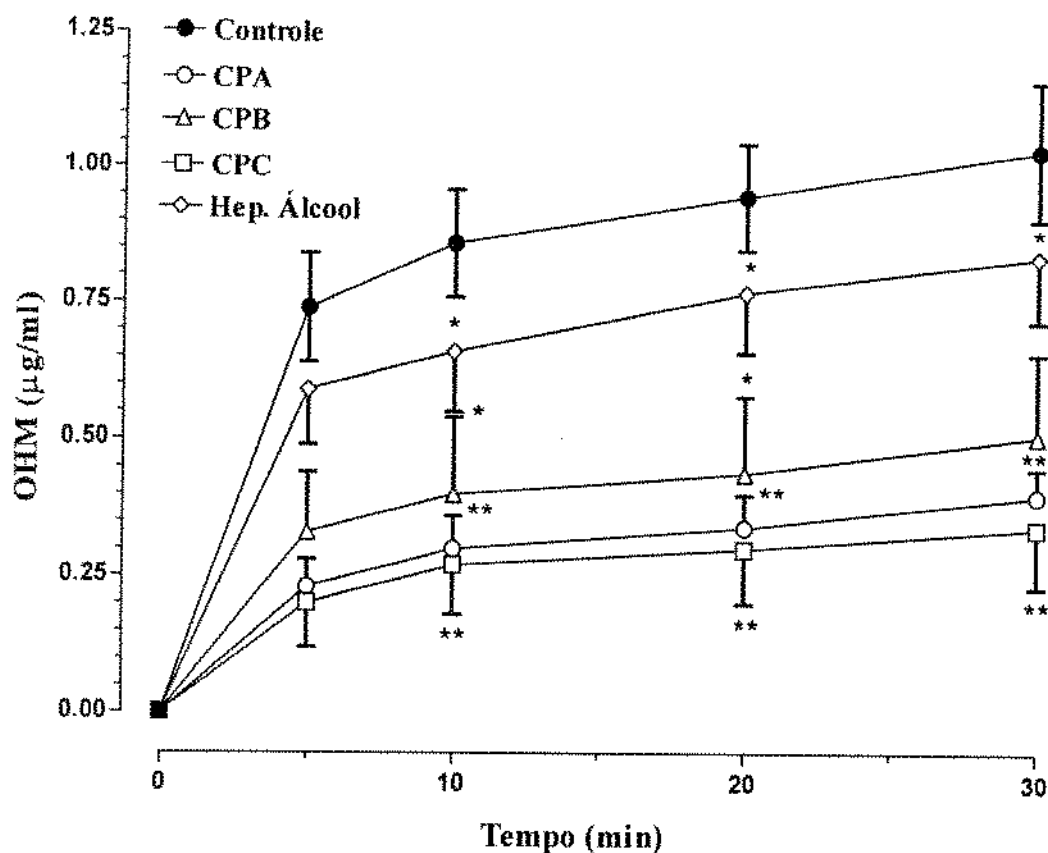


figura 2

Curva das concentrações plasmáticas de hidroximetronidazol (OHM) em relação ao tempo, para os grupos controle, hepatite alcoólica, cirrose hepática por álcool, estes últimos foram classificados de acordo com Child-Pugh em A (CPA), B (CPB) e C (CPC).

*, **, ***: $p < 0.05$, 0.01 e 0.001 , respectivamente, vs. grupo controle.

#, ##, ###: $p < 0.05$, 0.01 e 0.001 , respectivamente, vs. grupo hepatite alcoólica.

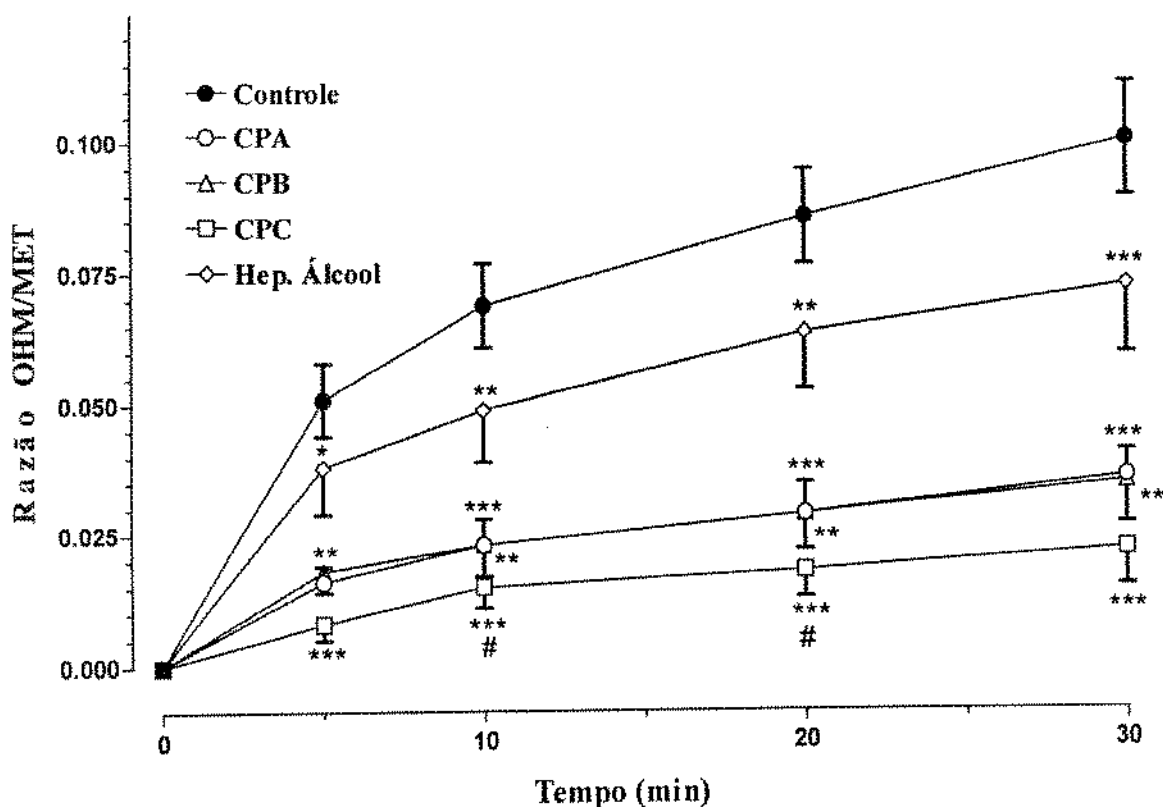


figura 3

Curva da razão plasmática hidroximetronidazol/metronidazol (OHM/MET) em relação ao tempo, para os grupos controle, hepatite alcoólica, cirrose hepática por álcool, estes últimos foram classificados de acordo com Child-Pugh em A (CPA), B (CPB) e C (CPC).

*, **, ***: $p < 0.05$, 0.01 e 0.001 , respectivamente, vs. grupo controle.

#, ##, ###: $p < 0.05$, 0.01 e 0.001 , respectivamente, vs. grupo hepatite alcoólica.

4.2 Doença hepática por hepatite C

A tabela 2 mostra que os portadores assintomáticos de hepatite C, não apresentaram diferenças significativas quanto as enzimas AST, ALT e γ GT, quando comparados ao grupo controle, porém, quando comparados ao grupo hepatite C crônica, os resultados foram significativos (portadores assintomáticos de hepatite C: AST - $18,9 \pm 1,0$ U.I./ml, $p < 0,001$; ALT - $18,5 \pm 1,3$ U.I./ml, $p < 0,01$; γ GT - $17,9 \pm 2,9$ U.I./ml, $p < 0,001$; hepatite C crônica: AST - $72,3 \pm 15,3$ U.I./ml, ALT - $137,5 \pm 39,3$ U.I./ml; γ GT $57,5 \pm 6,2$ U.I./ml). O grupo hepatite C crônica quando comparado ao grupo controle, apresentou os seguintes resultados (respectivamente), com relação as enzimas: AST - $72,3 \pm 15,3$ U.I./ml, $20,3 \pm 3,0$ U.I./ml, $p < 0,001$; ALT - $137,1 \pm 39,3$ U.I./ml, $19,6 \pm 2,4$ U.I., $p < 0,01$; γ GT: $57,5 \pm 6,2$ U.I., $29,3 \pm 5,6$ U.I., $p < 0,001$. Não houve diferença significativa com relação às bilirrubinas totais e tempo de protrombina nos grupos portador assintomático de hepatite C e hepatite C crônica, quando comparados ao controle.

A figura 4 mostra que não houve diferença em relação as concentrações plasmáticas de metronidazol entre os grupos controle e os portadores assintomáticos de hepatite C, bem com entre os primeiros e os pacientes com hepatite C crônica. Por outro lado, as concentrações de hidroximetronidazol (figura 5) mostraram-se significativamente diminuídas nos grupos de pacientes estudados, quando comparados ao controle.

A razão hidroximetronidazol/metronidazol (figura 6), já aos dez minutos, demonstrou de modo significativo a redução da capacidade de metabolização do metronidazol nos indivíduos tanto do grupo portador assintomático de hepatite C ($0,043 \pm 0,005$), quanto do grupo hepatite C crônica ($0,034 \pm 0,003$), ambos com $p < 0,001$, quando comparados ao grupo controle ($0,078 \pm 0,005$).

Tabela 2

Resultados dos testes bioquímicos de função e lesão hepática dos portadores assintomáticos HCV, hepatite C crônica e controle.

	Controle	HCV Assintomático	Hepatite crônica HCV
AST(U.I./ml)	20,3 ± 3,0	18,9 ± 1,0 ^{###}	72,3 ± 15,3 ^{***}
ALT (U.I./ml)	19,6 ± 2,4	18,5 ± 1,3 ^{##}	137,1 ± 39,3 ^{**}
γ-GT (U.I./ml)	23,9 ± 5,6	17,9 ± 2,9 ^{###}	57,5 ± 6,2 ^{***}
Bilirrubina Total (mg%)	0,9 ± 0,2	1,0 ± 0,2	1,3 ± 0,2
Tempo de protrombina (seg.)	12,9 ± 0,5	12,5 ± 0,2	12,8 ± 0,4

*, **, ***: p < 0.05, 0.01 e 0.001 vs. grupo controle, respectivamente.

#, ##, ###: p < 0.05, 0.01 e 0.001 vs. grupo hepatite C crônica , respectivamente.

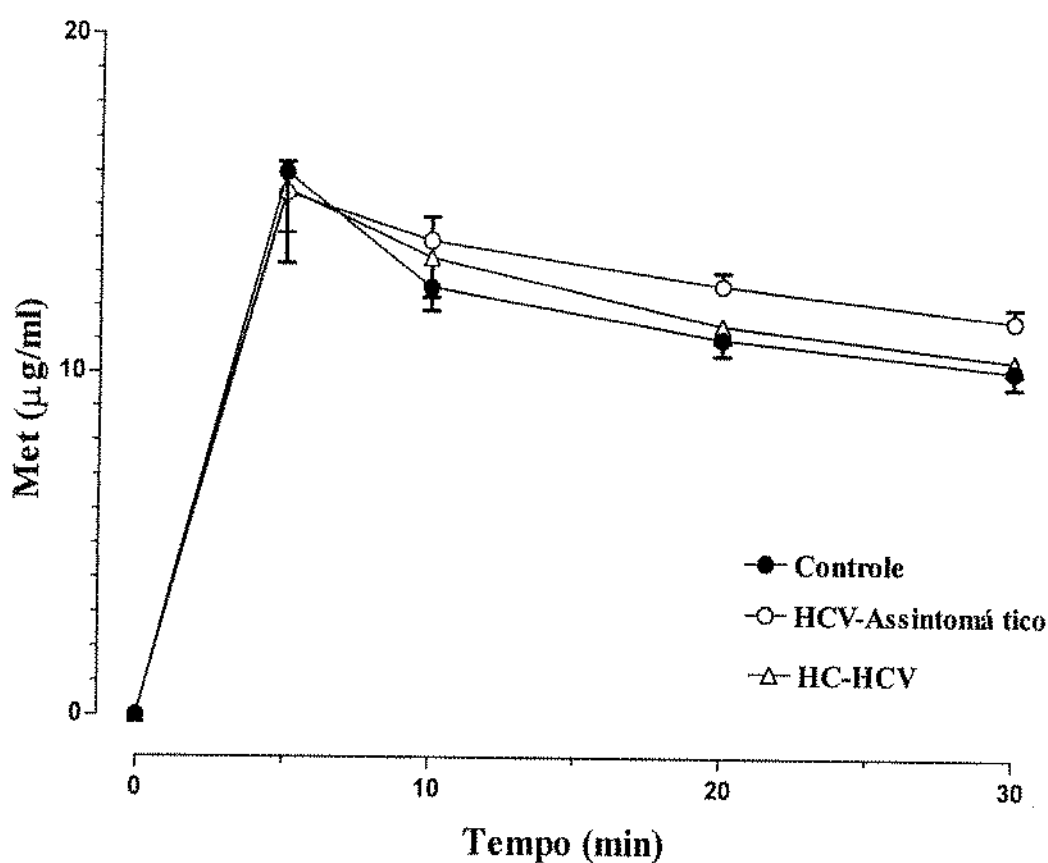


figura 4

Curva das concentrações plasmáticas de metronidazol (Met) em relação ao tempo, para os grupos controle, portadores assintomáticos de hepatite C (HCV assintomático) e hepatite C crônica (HC-HCV).

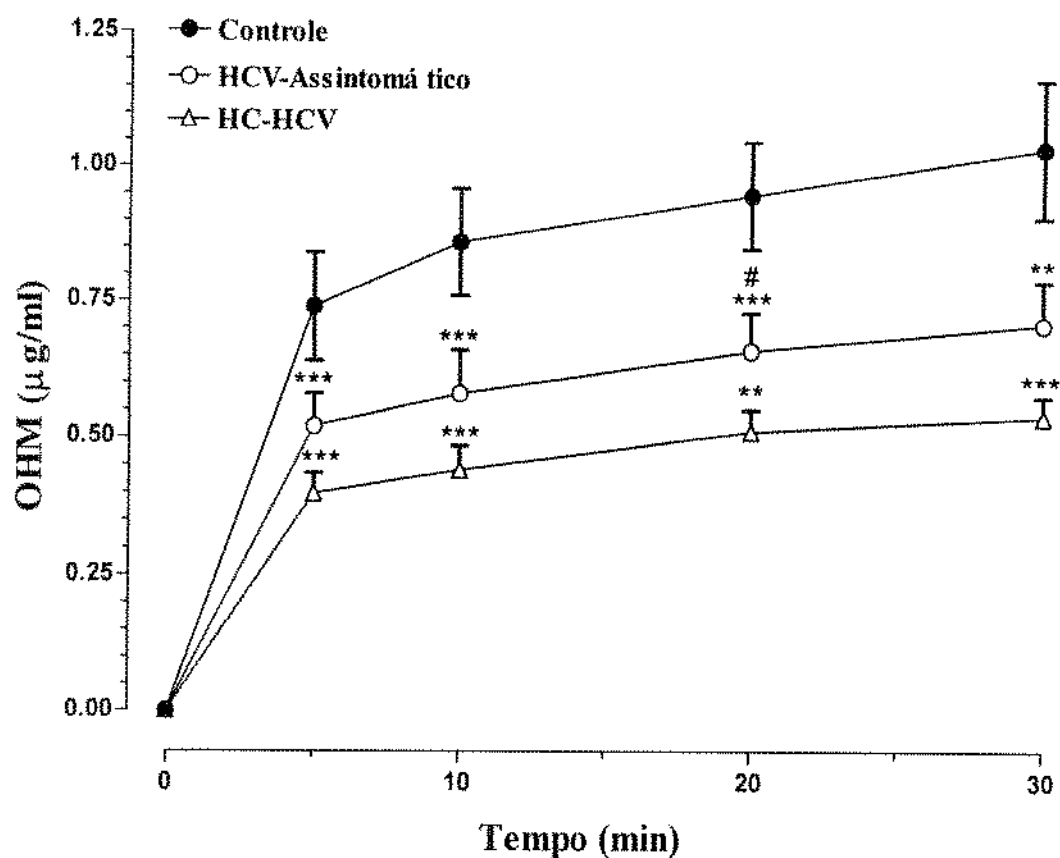


figura 5

Curva das concentrações plasmáticas de hidroximetronidazol (OHM) em relação ao tempo, para os grupos controle, portadores assintomáticos de hepatite C (HCV assintomático) e hepatite C crônica (HC-HCV).

*, **, ***: $p < 0.05$, 0.01 e 0.001 , respectivamente, vs. grupo controle.

#, ##, ###: $p < 0.05$, 0.01 e 0.001 , respectivamente, vs. grupo hepatite C crônica.

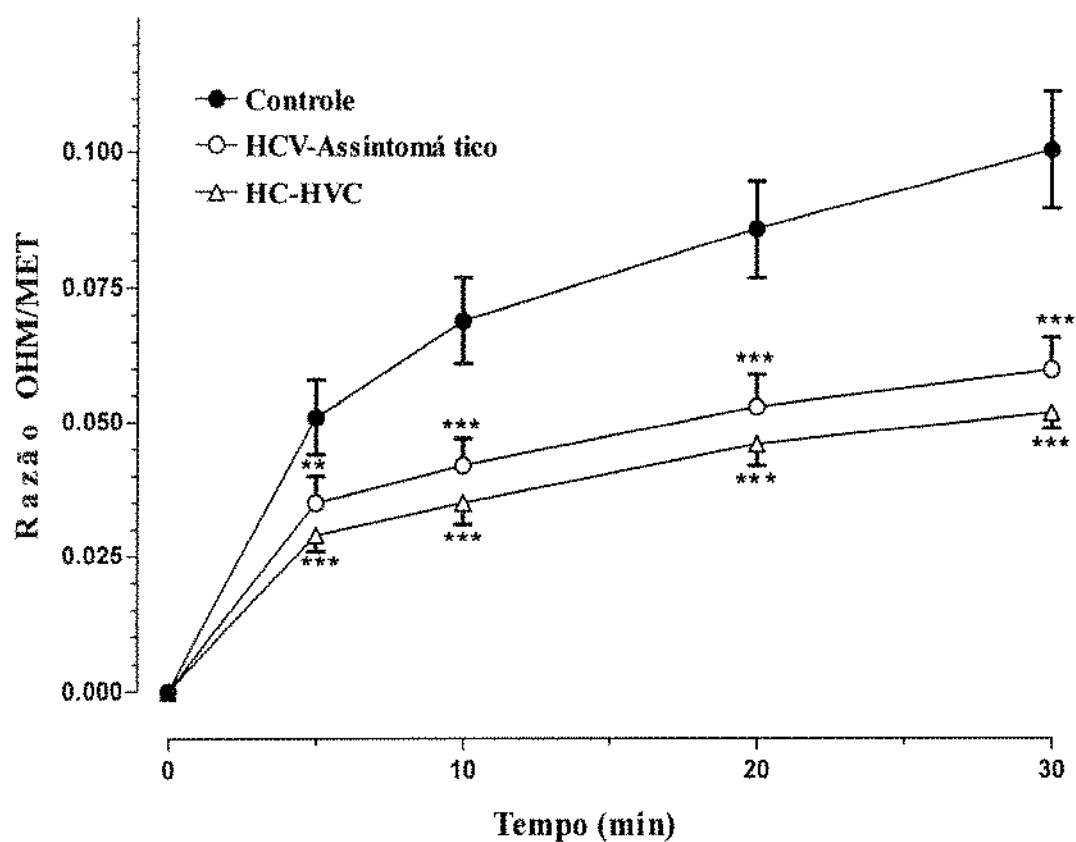


figura 6

Curva da razão plasmática hidroximetronidazol/metronidazol (OHM/MET) em relação ao tempo, para os grupos controle, portadores assintomáticos de hepatite C (HCV assintomático) e hepatite C crônica (HC-HCV).

*, **, ***: $p < 0.05$, 0.01 e 0.001 , respectivamente, vs. grupo controle.

#, ##, ###: $p < 0.05$, 0.01 e 0.001 , respectivamente, vs. grupo hepatite C crônica.

5. *Discussão*

Avanços no tratamento clínico das doenças do fígado e o sucesso do transplante hepático evidenciam a necessidade de se estimar a função hepática em indivíduos com hepatite crônica e cirrose, para a caracterização de grupos de risco de desenvolvimento de complicações, ou com pior prognóstico a curto e médio prazo. Infelizmente, elevações dos níveis séricos de AST e ALT não refletem a gravidade da doença, e a bilirrubina sérica, albumina e tempo de protrombina podem estar normais nos indivíduos que ainda não desenvolveram, ou apresentam-se em estágios iniciais de cirrose hepática cirrose (SCHIFFMAN et al., 1994). A biópsia é comumente utilizada tanto para estimar a gravidade da doença quanto para monitorar o tratamento. Testes dinâmicos de função hepática têm sido utilizados para complementar os testes bioquímicos convencionais em pacientes com cirrose (SCHIFFMAN et al., 1994); estes testes incluem as medições do *clearance* de verde de indocianina (HARTMANN et al., 1989; CAESAR et al., 1961), bromossulfaleína (JABLONSKI et al., 1969), cafeína (WANG et al.), antipirina (ANDREASEN et al., 1974), galactose (TYGSTRUP et al., 1966) e lidocaína (SHIFFMAN et al., 1992). Contudo, estes testes não se alteram na presença de lesões histológicas mínimas (SHIFFMAN et al., 1994).

A análise da razão metabólitos/substratos como indicadoras da função hepática, tem crescido em importância comparada com a avaliação por *clearance*, visto que é mais fidedigna em estimar, especificamente, a função enzimática (BROCKMOLLER & ROOTS, 1994).

Recentemente, a razão plasmática hidroximetronidazol/metronidazol aos dez minutos após a infusão do metronidazol foi proposta como um teste dinâmico de função hepática e mostrou-se sensível o bastante para distinguir indivíduos sadios de pacientes com cirrose hepática classificados como Child-Pugh A (MUSCARÁ et al., 1995).

Este estudo foi realizado com o intuito de avaliar o metabolismo do metronidazol, através da razão plasmática OHMET/MET em indivíduos com

doença hepática alcoólica (hepatite alcoólica, cirrose hepática) e doença hepática por vírus da hepatite C (HCV assintomático e hepatite crônica por HCV).

Os resultados deste trabalho demonstram um decréscimo na metabolização do metronidazol, com conseqüente aumento de sua meia vida no plasma dos pacientes estudados, quando comparados ao grupo controle. A determinação da concentração do hidroximetronidazol no plasma destes pacientes confirma a deficiência de metabolização do metronidazol, visto que sua concentração é tanto menor quanto maior a gravidade da doença hepática.

As maiores diferenças estatisticamente significativas foram observadas ao comparar a razão hidroximetronidazol/metronidazol dos grupos de pacientes estudados, com o grupo controle. Contudo, diferenças estatisticamente significativas não foram observadas quando comparamos os pacientes com cirrose hepática classificados como Child-Pugh A, com os pacientes do grupo Child-Pugh B. Isto pode dever-se ao fato de que as doenças crônicas do fígado podem ter uma fase de compensação em *plateau*, onde os achados clínicos e parâmetros laboratoriais convencionais estão relativamente estáveis, apesar da progressão da doença (GREMSE et al., 1990). Este fato poderia, até mesmo, dificultar a classificação destes pacientes de acordo com os critérios de Child-Pugh, visto que o mesmo utiliza-se de parâmetros clínicos e laboratoriais convencionais.

A metabolização de drogas pelo fígado encontra-se diminuída na doença hepática (WILLIAMS, 1983). Muitos fatores contribuem para isto como as alterações no fluxo sangüíneo, devido a “*shunts porto-sistêmicos*”, que limitam o *clearance* sistêmico quando da ausência do reflexo compensatório de aumento do fluxo através da artéria hepática, este fato influencia principalmente o *clearance* das drogas de alta extração. Além das alterações no fluxo sangüíneo, a diminuição da capacidade intrínseca de metabolização, por redução dos níveis enzimáticos, ou da atividade enzimática, são importantes (WILKINSON & SHAND, 1975). Outros fatores incluem: a) a diminuição da massa celular, b) a capilarização sinusoidal,

que ocorre em consequência da perda da fenestração do endotélio, desenvolvimento da lâmina basal e deposição de complexos macromoleculares no espaço de Disse; tendo como consequência a limitação da difusão de solutos, c) a limitação do acesso de oxigênio para os hepatócitos, d) a diminuição da síntese de proteínas, com consequente diminuição de sua ligação às drogas (MCLEAN & MORGAN, 1991).

As proteínas do sistema citocromo P450 estão seletivamente alteradas na doença crônica do fígado, algumas profundamente diminuídas, outras menos (GEORGE et al., 1995), ou achar-se até mesmo induzidas, como as do CYP 2E1 (TSUTSUMI et al., 1989). Em adição, a doença hepática prejudica preferencialmente a metabolização de drogas por oxidação enquanto que a glucuronidação parece estar preservada (CALLAGHAN et al., 1993).

Uma característica da doença hepática alcoólica é a predominância das lesões na área perivenular ou zona 3 do ácino hepático (TSUTSUMI et al., 1989), onde se encontram localizadas a maior parte das enzimas do citocromo P450, devido a uma proliferação do retículo endoplasmático.

O índice de Maddrey, é utilizado como índice prognóstico em pacientes com hepatite alcoólica e é determinado pela fórmula: $4,6 \times \text{tempo de protrombina (seg.)} + \text{bilirrubina (mg/dl)}$ (MADDREY et al., 1978). Apesar de que a maioria dos episódios de hepatite alcoólica nos pacientes estudados terem sido considerados como leves, de acordo com o índice de Maddrey, o metabolismo do metronidazol mostrou-se diminuído o que pode dever-se a uma disfunção do citocromo P450. O fato de algumas citocinas e o interferon gamma inibirem a expressão e a atividade de algumas enzimas do sistema citocromo P450 (ABDEL-RAZZAK et al., 1993; TAPNER et al., 1996), pode explicar a diminuição do metabolismo do metronidazol observado nestes pacientes.

Conclui-se portanto que a diminuição do metabolismo do metronidazol, nos pacientes com doença hepática de etiologia alcoólica, pode dever-se a uma disfunção da enzima do sistema citocromo P450 que metaboliza o metronidazol.

Dentre os pacientes portadores de doença hepática associada ao vírus da hepatite C, foi observado um maior impedimento do metabolismo do metronidazol quanto maior a gravidade da doença, fato este observado quando os grupos de pacientes foram comparados com o grupo controle.

Os indivíduos classificados no grupo HCV assintomático, eram indivíduos com teste sorológico positivo para o vírus da hepatite C e com os resultados dos testes bioquímicos convencionais dentro dos limites da normalidade. O teste de reação em cadeia da polimerase (PCR) não foi realizado por impossibilidade técnica. Portanto, este grupo pode conter, na realidade, pacientes portadores assintomáticos, pacientes com hepatite C curada e pacientes em evolução para a forma crônica, mas cujo dano hepático não se reflete nos resultados dos testes bioquímicos convencionais.

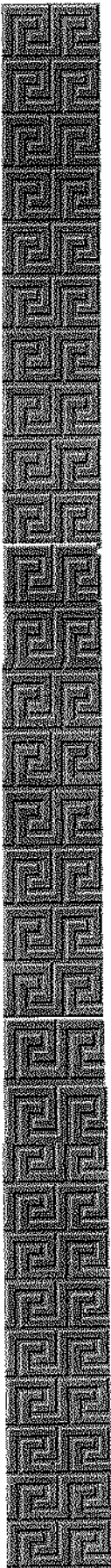
Aproximadamente 95% dos indivíduos infectados pelo HCV podem ser identificados por um teste anti HCV de segunda geração como EIA. Contudo este teste não é capaz de diferenciar uma infecção pregressa de uma infecção ativa (SHINDO et al., 1995). Tem sido demonstrado que o HCV RNA foi detectado no soro de aproximadamente 50% dos indivíduos anti-HCV positivos e com testes bioquímicos de função hepática normais (ALBERT et al., 1991), sendo que muitos deles apresentam lesão hepática (ALBERT et al., 1992). Contudo, alguns indivíduos HCV RNA positivos foram descritos como tendo histologia hepática normal (BRILLANTI et al., 1993). Devido ao fato de que uma porcentagem de indivíduos com anticorpos para o HCV, com positividade para HCV RNA, possuírem níveis normais das enzimas hepáticas, lesões histológicas mínimas, ou não possuírem lesões, os níveis de HCV RNA não correspondem com o grau de lesão histológica hepática (SHAKIL et al., 1995). Por isso, presume-se que a

diminuição do metabolismo do metronidazol não seja somente causada pela destruição dos hepatócitos, e sim por outros mecanismos.

Muitas infecções virais ou bacterianas tem sido associadas com a diminuição do metabolismo, mediado pelo citocromo P450, de várias drogas. Isto têm sido atribuído, pelo menos em parte, à liberação de citocinas, dentre elas a interleucina 2 (THAL et al., 1993), a interleucina 4 (ABDEL-RAZZAK et al., 1993) e o interferon gamma, que parece inibir a expressão genética e a atividade catalítica de enzimas do citocromo P450 (TAPNER 1996). Níveis elevados destas citocinas são descritas na hepatite C crônica (CACCIARELLI et al., 1996). Por outro lado, a citólise que ocorre no curso do processo inflamatório, expõe a face citoplasmática da membrana do retículo endoplasmático, que contém o citocromo P450 (Waxman et al., 1988). Auto-anticorpos formados durante a evolução da hepatite crônica são capazes de reconhecer estas formas de citocromos P450 (Waxman et al., 1988), isto aumenta a possibilidade da interferência do processo de autoimunidade no metabolismo do metronidazol.

O que poderia explicar a diminuição do metabolismo do metronidazol nos pacientes com doença hepática associada ao vírus da hepatite C seria a alteração da função do citocromo P450 mediado por citocinas, ou mediado por um processo de autoimunidade.

A determinação da razão hidroximetronidazol/metronidazol mostrou-se eficaz para a identificação de disfunção hepática, tanto nos indivíduos portadores assintomáticos da hepatite C, quanto para os indivíduos com cirrose hepática classificados como Child-Pugh A, nos quais a lesão histológica é mínima. Isto sugere ser este um bom teste para a detecção de indivíduos susceptíveis ao desenvolvimento ou agravamento da hepatopatia, podendo ter implicações, também, no que diz respeito à introdução precoce da terapêutica, visando diminuir a progressão da doença e das suas complicações.



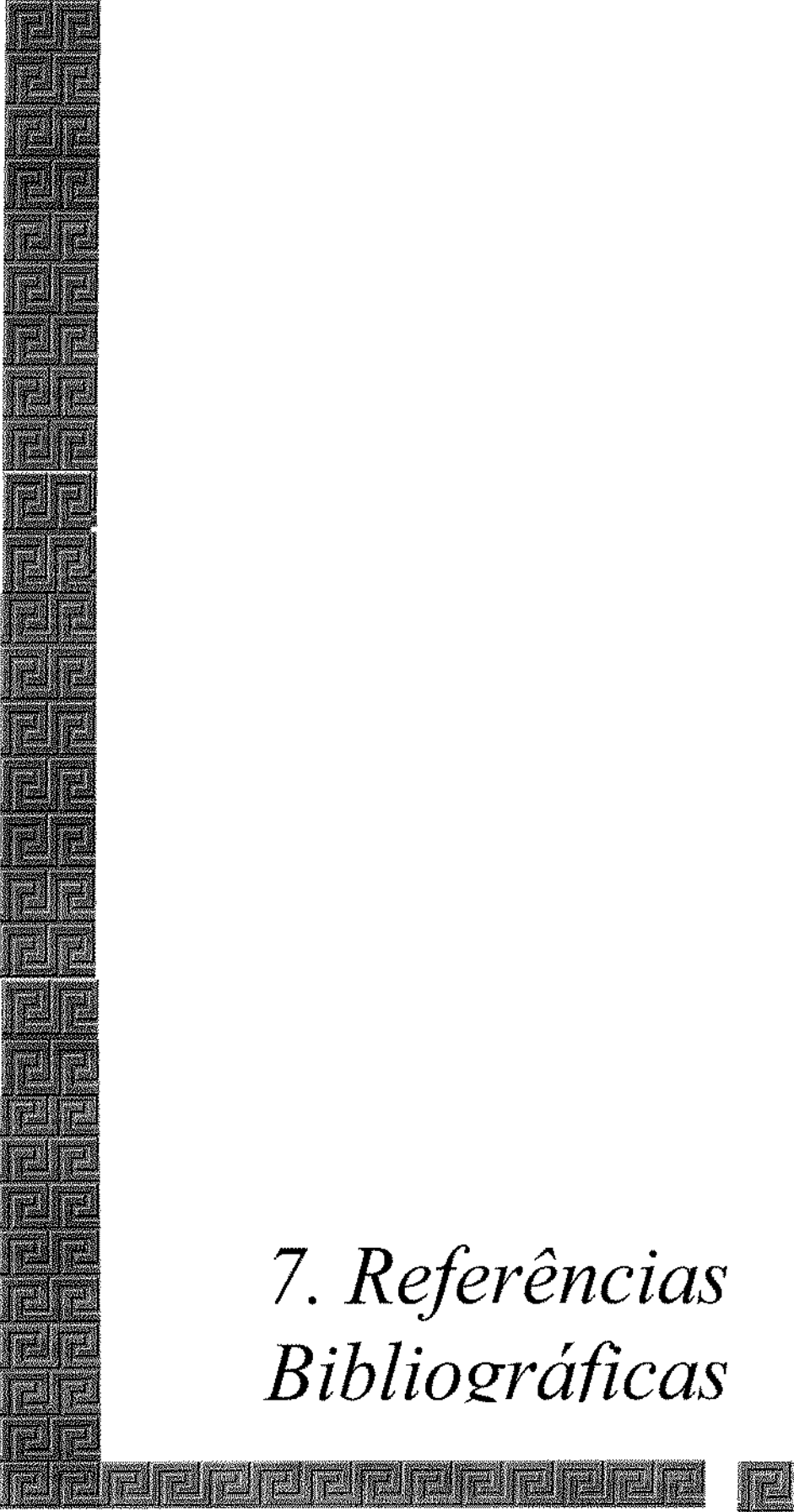
6. *Summary*

Standart liver biochemistry tests are not useful for assessing hepatic function or predicting development of cirrhosis. Dynamic liver function tests such as indocyanine green clearance, caffeine elimination and lidocaine metabolism have been used to complement standart liver assesment in patients with liver disease. Nevertheless, those tests are not altered in mild histological lesions.

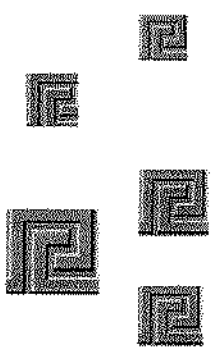
In this work, the plasma hydroxymetronidazole/ metronidazole ratio was evaluated in patients with alcoholic cirrhosis, classified according Child-Pugh to A (n = 9), B (n = 9) and C (n = 8), with alcoholic hepatitis (n = 23), with chronic hepatitis C (n = 13) and asymptomatic carriers of hepatitis C virus antibody (n = 14). The results were compared with those from a control group (n = 12).

The metronidazole and its hydroxy metabolite concentration was measured by HPLC reverse phase with u.v. detection and the ratio hydroxymetronidazole/metronidazole was calculated and plotted as a function of time.

Plasma metronidazole concentrations were similar in all groups studied, while plasma hydroxymetronidazole were significantly reduced. The hydroxymetronidazole/metronidazole ratio was progressively reduced according to the degree of liver damage. This phenomenon was observed in sample collected from patients of different groups 10 minutes following the end of metronidazole infusion (healthy volunteers $0,078 \pm 0,005$; alcoholic hepatitis $0,045 \pm 0,008$, $p < 0,01$; alcoholic cirrhosis: Child-Pugh A $0,022 \pm 0,005$, $p < 0,001$, B $0,032 \pm 0,008$, $p < 0,01$, C $0,013 \pm 0,004$, $p < 0,001$; asymptomatic carriers of hepatitis C virus antibody $0,043 \pm 0,005$, $p < 0,001$; chronic hepatitis C $0,034 \pm 0,003$, $p < 0,001$). This test seems to be sensible enough to discriminate Child-Pugh A cirrhotic patients and healthy carrier of hepatitis C virus infection from the healthy individuals.



7. Referências Bibliográficas



- ABDEL-RAZZAK, Z.; LOYER, P.; FAUTREL, A.; GAUTIER, J. C.; CORROS, L.; TURLIN, B.; BEAUNE, P.; GUILLOUZO, A. - Cytokines down-regulate expression of major cytochrome P450 enzymes in adult human hepatocytes in primary culture. **Mol. Pharmacol.**, **44**(4):707-715, 1993.
- ACHORD, J.L. - Review of alcoholic hepatitis, and its treatment. **Am. J. Gastroenterol.**; **88**(11):1822-1831, 1993.
- ALBERS, I.; HARTMAN, H.; BIRCHER, J.; CREUTZFIELD, W. - Superiority of the Child-Pugh classification to quantitative liver function test for assessing prognosis of liver cirrhosis. **Scand. J. Gastroenterol.**, **24**(3): 269-276, 1989.
- ALBERTI, A.; CHEMELLO, L.; CAVALLETTO, D.; TAGGER, A.; DAL CANTON, A.; BIZZARO, N.; TAGARIELLO, G.; RUOL, A. - Antibody to hepatitis C virus and liver disease in volunteer blood donor. **Ann. Intern. Med.**, **114**(12):1010-1012, 1991.
- ALBERTI, A.; MORSICA, G.; CHEMELLO, L.; CAVALLETTO, D.; NOVENKA, F.; PONTUSSO, P.; RUOL, A.- Hepatitis C viraemia and liver disease in symptom free individuals with anti-HCV. **Lancet**, **340**(8821):697-698, 1992.

- ALTER, M.J.; MARGOLIS, H.S.; KRAWCZYNSKI, K.; JUDSON, F.N.; MARES, A.; ALEXANDER, W.J.; HU, P.Y.; MILLER, J.K.; GERBER, M.A.; SAMPLINER, R.E. - The natural history of community acquired hepatitis C in the United States. **N. Engl. J. Med.**, 327(27):1899-1905, 1992.
- ANDERSON, P.; & SCOTT, E. - The effect of general practitioners advice to heavy drinking men. **Br. J. Addict.**, 87(6):891-900, 1992.
- ANDREASEN, P.B.; RANEK, L.; STATLAND, B.E.; TYGSTRUP, N. - Clearance of antipyrine dependence of quantitative liver function. **Eur. J. Clin. Invest.**, 4(2):129-134, 1974.
- ARAI, M.; GORDON, E.R.; LIEBER, C.S. - Decreased cytochrome oxidase activity in hepatic mitochondria after chronic ethanol consumption and the possible role of decreased cytochrome aa₃ content and changes in phospholipids. **Biochem. Biophys. Acta**, 797(3):320-327, 1984.
- ARAI, M.; LEO, M.A.; NAKANO, M.; GORDON, E.R.; LIEBER, C.S. - Biochemical and morphological alterations of baboon hepatic mitochondria after chronic ethanol consumption. **Hepatology**, 4(2):165-174, 1984.
- ARTHUR, M.J.; LEE, A.; WRIGHT, R. - Sex differences in the metabolism of ethanol and acetaldehyde in normal subjects. **Clin. Sci.**, 67(4):397-401, 1984.
- BATTEGAY, M. - Immunity to hepatitis C virus: a further piece of the puzzle. **Hepatology**, 24(4):961-963, 1996.

- BEAUNE, P.; DANSETTE, P.M.; MANSUY, D.; KIFFEL, L.; FINCH, M.; AMAR, C.; LEROUY, J.P.; HOMBERG, J.C. - Human anti-endoplasmatic reticulum autoantibodies appearing in a drug-induced hepatitis are directed against a human liver cytochrome P450 that hydroxylates the drug. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, **84**(2): 551, 1987.
- BEDOSSA, P.; & POYNARD, T. - An algorithm for the grading of activity in chronic hepatitis C. **Hepatology**, **24**(2) :289-293, 1996.
- BEHRENS, U.J.; HOERNER, M.; LASKER, M.J.; LIEBER, C.S. - Formation of acetaldehyde adducts with ethanol - inducible P₄₅₀ II E1 in vivo. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, **154**(2):584-590, 1988.
- BOOBIS, A.R.; & DAVIES, D.S. - Human cytochromes P450. **Xenobiotica**, **14**(1/2):151-185, 1984.
- BORING, C.C.; SQUIRES, T.S.; TONG T. - Cancer Statistics: 1993. **Cancer J. Clin.**, **43**(1):7-26, 1993.
- BRADLEY, D.W. - Virology, molecular biology, and serology of hepatitis C virus. **Transfus. Med. Rev.**, **6**(2):93-102, 1992.
- BRANCH, R.A.; HERBERT, C.M.; READ, A.E. - Determinants of serum antipyrine half- lives in patients with liver disease. **Gut**, **14**:659-573, 1973.

- BRILLANTI, S.; FOLI, M.; GAIANI, S.; MASCI, C.; MIGLIOLI, M.;
BARBARA, L. - Persistent hepatitis C viraemia without liver disease.
Lancet, **341**(8843):464-465, 1993.
- BROCKMOLLER, J.; & ROOTS, I. - Assessment of liver metabolic function.
Clin. Pharmacokinet., **27**(3):216-248, 1994.
- BRODIE, B.B.; & AXELROD, J. - The fate of antipyrine in man. **J. Pharmacol.**
Exp. Ther., **98**:97-104, 1950.
- BRODY, D.H.; & LEICHTER, L. - Clearance tests of liver function. **Med. Clin.**
North Am., **63**(3):621-630, 1979.
- BROGDEN, R.N.; & HEEL, R.C.; SPEIGHT, T.M. - Metronidazole in anaerobic
infections : a review of its activity, pharmacokinetics and therapeutic use.
Drugs, **16**(5):387-417, 1978.
- BROWN, J. - Hepatitis C: the structure and biology of the virus and diagnosis
tests. **J. Infect.**, **30**(2):95-101, 1995.
- CACCIARELLI, T.V.; MARTNEZ, O.M.; GISH, R.G.; VILLANUEVA, J.C.;
KRAMS, S.M. - Immunoregulatory cytokines in chronic hepatitis C virus
infection: pre and post treatment with interferon alfa. **Hepatology**, **24**(1):6-9,
1996.

- CAESAR, J.; SHALDON, S.; CHIANDUSSI, L.; GUEVARA, L.; SHERLOCK, S. -The use of indocyanine green in the mensurement of hepatic blood flow and as a test of hepatic function. **Clin. Sci.**, **21**:43-57, 1961.
- CALLAGHAN, R.; DESMOND, P.V.; PAUL, P.; MASHFORD, M.L.- Hepatic enzyme determining elimination rate of high-clearance drugs in cirrhosis. **Hepatology**, **18**(1):54-60, 1993.
- CASINI, A.; CUNNINGHAM, M.; KOJKIND, M.; LIEBER, C.S. - Acetalhyde increases procollagen type I and fibronectin gene transcription in cultured rat fat - storing cells through a mechanism. **Hepatology**, **13**(4):758-765, 1991.
- CASTILLA, A.; PRICTO, J.; FAUSTO, N. - Transforming growth factors beta 1 and alpha in chronic liver disease. Effects of interferon alpha therapy. **N. Engl. J. Med.**, **324**(14):933-940, 1991.
- CAULET, S.; FABRE, M.; SCHOEVAERT, D.; LESTY, C.; MEDURI, G.; MARTIN, E. Quantitative study of centrilobular hepatic fibrosis in alcoholic disease before cirrhosis. **Virchows. Arch. A. Pathol. Anat. Histopathol.**, **416**(1):7-11, 1989.
- CHAWLA, R.K.; WOLF, D.C.; KUTNER, M.H.; BONKOVSKY, H.L - Choline may be an essential nutrient in malnourished patients with cirrhosis. **Gastroenterology**, **97**(6):1514-1520, 1989.

- CHENG, W.S.; MURPHY, T.L.; SMITH, M.T.; COOKSLEY, W.G.; HALLIDAY, J.W.; POWELL, L.W. - Dose-dependent pharmacokinetics of caffeine in humans. Relevance as a test of quantitative liver function. **Clin. Pharmacol. Ther.**, 47:516-524, 1990.
- CHERRICK, G.R.; STEIN, S.W.; LEEVY, C.M.; DAVIDSON, C.S. - Indocyanine green: observations on its physical properties, plasma decay and hepatic extraction. **J. Clin. Invest.**, 39:592-600, 1960.
- COLE-HARDING, S.; WILSON, J.R. - Ethanol metabolism in men and women. **J. Stud. Alcohol.**, 48(4):380-387, 1987.
- COLIN, N.; PALMER, C.N.; COATES, P.J.; DAVIES, S.E.; SHEPHARD, E.A.; PHILLIPS, I.R. - Localization of cytochrome P₄₅₀ gene expression in normal and decreased human liver by in hybridization of wax-embedded archival material. **Hepatology**, 16(3):682-687, 1992.
- COLLI, A.; BUCCINO, G.; COCCIOLO, M.; PARRAVICINI, R., SCALTINO, G. - Disposition of a flow-limited drug (lidocaine) and a metabolic capacity-limited drug (theophy) in liver cirrhosis. **Clin. Pharmacol. Ther.**, 44:642-649, 1988.
- COLOMBO, M.; DE FRANCHIS, R.; DEL NINHO, E.; SANGIOVANI, A.; DE FAZIO, C.; TOMMASINI, M.; DONATO, M.F.; PIVA, A.; DI CARLO, V.; DIOGUARDI, N. - Hepatocellular carcinoma in Italian patients with cirrhosis. **N. Engl. J. Med.**, 325(10):675-680, 1991.

CRABB, D.W. - Genetic factors and susceptibility to alcoholic liver damage. **J. R. Coll. Physicians Lond.**, **28(3)**:257, 1994.

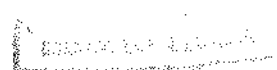
DANHOF, M.; VAN ZUILEN, A.; BOEIJINGA, J.K.; BREIMER, D.P. - Studies of the different metabolic pathways of antipyrine in man. Oral versus i.v. administration and the influence of urinary collection time. **Eur. J. Clin. Pharmacol.**, **21(5)**:433-441, 1982.

DANHOF, M.; VERBEEK, R.M.; VAN BOXTEL, C.J.; BOEIJINGA, J.K.; BREIMER, D.P. - Differential effects of enzyme induction on antipyrine metabolite formation. **Br. J. Clin. Pharmacol.**, **13(3)**:379-386, 1982.

DESMOND, P.V.; PATWARDHAN, R.V.; JOHNSON, R.F.; SCHENKER, R. Impaired elimination of caffeine in cirrhosis. **Dig. Dis. Sci.**, **25**:193-197, 1980.

DI BISCEGLIE, A.M.; GOODMAN, Z.D.; ISHAK, K.G.; HOOFNAGLE, J.H.; MELPOLDER, J.J.; ALTER, H.J. - Long-term chemical and histopathological follow-up of Chronic Posttransfusion hepatitis. **Hepatology**, **14(6)**:969-974, 1991.

DIAZ, D.; FABRE, I.; DAUJAT, M.; SAINT AUBERT, B.; BORIES, P.; MICHEL, H.; MAUREL, P. - Omeprazole is an arylhydrocarbon like inducer of human hepatic cytochrome P450. **Gastroenterology**, **99(3)**:737, 1990.



- DIEHL, A.M.; ABDO, S.; BROWN, N. - Supplemental putrescine reverses ethanol - associated inhibition of liver regeneration. **Hepatology**, 12(4):633-637, 1990.
- DOCAMPO, R. - Sensitivity of parasites to free radical damage by antiparasitic drugs. **Chem. Biol. Interact.**, 73(1):1-27, 1990.
- DONAHUE, T.M.JR.; CHAISSON, M.L.; LETTERMAN, R.K. - Plasma protein catabolism in ethanol and colchicine treated liver slices. **Alcohol. Clin. Exp. Res.**, 15(1):7-12, 1991.
- DUCE, A.M.; ORTIZ, P.; CABRERO, C.; MATO, J.M. - S-adenosyl-L-methionine synthetase and phospholipid methyltransferase are inhibited in human cirrhosis. **Hepatology**, 8(1):65-68, 1988.
- DUSHEIKO, G.; SCHMILOVITZ-WEISS, H.; BROWN, D.; MC OMISH, F.; YAP, P.L.; SHERLOCK, S.; MC INTYRE, N.; SIMMONDS, P. - Hepatitis C virus genotypes: an investigation of type specific differences in geographic origin and disease. **Hepatology**, 19(1):13-18, 1994.
- FAUSTO, N. & MEADLE, J.E. - Regulation of liver growth: protooncogenes and transforming growth factors. **Lab. Invest.**, 60(1):4-13, 1989.
- FINKELSTEIN, J.D. & MARTIN, J. - Methionine metabolism in mammals adaptation to methionine excess. **J. Biol. Chem.**, 261(33):1582-1587, 1986.

FREZZA, M.; DI PADOVA, C.; POZZATO, G.; TERPIN, M.; BARAONA, M.; LIEBER, C.S. - High blood alcohol levels in women: role of decreased gastric alcohol dehydrogenase activity and first pass metabolism. **N. Engl. J. Med.**, **322**(2):95-99, 1990.

FRIEDMAN, S.L. - Acetaldehyde and alcoholic fibrogenesis: fuel to fire but not the spark. **Hepatology**, **12**(3):609-611, 1990.

FUSCONI, M.; LENZI, M.; BALLARDINI, G.; MINIERO, R.; CASSANI, F.; ZAULLI, D.; BIANCHI, F.B. Anti-HCV testing in autoimmune hepatitis and primary biliaris cirrhosis. **Lancet**, **336**(8718):823, 1990.

GEORGE, J.; MURRAY, M.; BYTH, K.; FARREL, G.C. Differential alterations of cytochrome P450 proteins in liver from patients with severe chronic liver disease. **Hepatology**, **21**(1):120-128, 1995.

GEORGE, J.; LIDDLE, C.; MURRAY, M.; BYTH, K.; FARREL, G.C. - Pre-translational regulation of cytochrome P540 genes is responsible for disease-specific changes of individual P450 enzymes among patients with cirrhosis. **Biochem. Farmacol.**, **49**(7):873-881, 1995.

GINES, P.; ARROYO, V.; RODES, J. DAVIS, M. - Treatment of ascites and renal failure in cirrhosis. In: Davis, M.(ed.) - **Therapy of Liver Diseases**, **Bailliere's Clinics in Gastroenterology**. London, Saunders, 1989. p.165-186.

- GOLDBERG, D.M.; PARKES, J.G.; HANN, S. - Microsomal induction, alcohol, and lipoprotein metabolism: is there a three way relationship? **Clin. Biochem.**, 22(1):57-67, 1989.
- GORESKY, C.A.; BACH, G.U.; NADEAU, B.E. - On the uptake of material by the intact liver: the transport and net removal of galactose. **J. Clin. Invest.**, 52(5):991-1009, 1973.
- GREENWEL, P.; GEERTS, A.; OGATA, I.; HTERRUGO, J.A.S.; ROSKIND, M. - In : Arias IM , Boyer JL , Fausto N , Jacoby WB , Shachter DA , Shafritz DA. **The Liver : biology and pathobiology** , 3ed. New York : Raven Press, 1994. p.367-1381.
- GREMSE, D.A.; A-KADER, H.H.; SCHROEDER, T.J.; BALISTRERI, W.F. - Assessment of lidocaine metabolite formation as a quantitative liver function test in children. **Hepatology**, 12:565-569, 1990.
- HACKI, W.; BIRCHER, J. PREISIG, R. - A new look at the plasma disappearance of bromophthalein (BSP): correlation with BSP transport maximum and the hepatic plasma flow in man. **J. Lab. Clin. Med.**, 88(6):1019, 1976.
- HAHN, H.K.J.; & BURCH, R.E. Impaired ethanol metabolism with advancing age. **Alcohol. Clin. Exp. Res.**, 7(3):299-301, 1983
- HALLER, I. - In vitro activity of the two principal oxidative metabolites of metronidazole against *Bacteriodes fragilis* and related species. **Antimicrob. Agents. Chemother.**, 22(1):165-166, 1982.

- HENDERSON, J.M.; KUTNER, M.H.; BAIN, R.P. First-order clearance of plasma galactose: the effect of liver disease. **Gastroenterology**, 83(5):1090-1096, 1982.
- HILL, D.B.; MARSANO, L.S.; SHEDLOFSKY, S.I.; TALWALKAR, R.; MURALI, N.S.; MCCLAIN, C.J. - Increased plasma interleukin-8 levels in alcoholic hepatitis. **Hepatology**, 16:133A, 1992.
- HOEK, J.B.; THOMAS, A.P.; ROONEY, T.A.; HIGASHI, K.; RUBIN, E. - Ethanol and signal transduction in the liver. **Faseb. J.**, 6(7):2386-2396, 1992.
- HOERNER, M.; BEHRENS, U.J.; WÖRNER, T.M.; BLACKSBERG, I.; BRALY, L.F.; SCHAFFNER, F.; LIEBER, C.S. - The role of alcoholism and liver disease in the appearance of serum antibodies against acetaldehyde adducts. **Hepatology**, 8(3):569-574, 1988.
- HOROWITZ, J.H.; RYPINS, E.B.; HENDERSON, J.M.; HEYMSFIELD, S.B.; MOFFITT, S.D.; BAIN, R.P.; CHAWLA, R.K.; BLEIER, J.C.; RUDMAN, D. - Evidence for impairment of transsulfuration pathway in cirrhosis. **Gastroenterology**, 81:668-675, 1981.
- HUET, P.M.; & LELORIER, J. - Effects of smoking and chronic hepatitis B on lidocaine and indocyanine green kinetics. **Clin. Pharmacol. Ther.**, 28(2):208-215, 1980.

- HUMPHRIES, T. J. - Clinical implications of drug interactions with the cytochrome P450 enzyme system associated with omeprazole. **Dig. Dis. Sci.**, **36**(12):1665, 1991.
- INGELMAN-SUNDBERG, M.; JOHANSSON, F.; PENTTILA, K.E.; GLAUMANN, H.; LINDROS, K.O. - Centrilobular expression of ethanol-inducible cytochrome P₄₅₀ II E1 in rat liver. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, **157**(1):55-60, 1988.
- JABLONSKI, P.; & OWEN, J.A. - The clinical chemistry of bromosulfophthalein and other cholefilic dyes. **Adv. Clin. Chem.**, **12**:310-386, 1969.
- JENKINS, W.J.; CAKEBREAD, K.; PALMER, K.R. - Effect of alcohol consumption on hepatic aldehyde dehydrogenase activity in alcoholic patients. **Lancet**, **1**(8385):1048-1049, 1984.
- JENNETT, R.B.; SCIFFARI - FARD, A.; SORRELL, M.F.; SMITH, S.L.; TUMA, D.J. - Increased covalent binding of acetaldehyde to calmodulin in the presence of calcium. **Life Sci.**, **45**(16):1461-1466, 1989.
- JONHSON, P. J. - Metronidazole and drug resistance. **Parasitol. Today** **9**:183-186, 1993.
- JOST, G.; WAHLLAENDER, A.; VONMANDACH, U.; PREISIG, R. - Overnight salivary caffeine clearance. A liver function test suitable for routine use. **Hepatology**, **7**(2):338-344, 1987.

JUAN, D.; WORWAG, E.M.; SCHOELLER, D. A.; KOTAKE, A.N, ITUGHIS, R.L. FREDERIKSEN, M.C. - Effect of dietary protein on theophylline pharmacokinetics and caffeine and aminopyrine breath tests. **Clin. Pharmacol. Ther.**, 40(2):187-194, 1986.

KAMIMURA, S.; GAAL, R.; BRITTON, R.S.; BACON, B.R.; TRIADAFILOPOULOS, G.; TSUKAMOTO, H. - Increased 4 - hydroxycynoneal levels in experimental alcoholic liver disease: association of lipid peroxidation with liver fibrogenesis. **Hepatology**, 16(2): 448-453, 1992.

KATO, S.; KAWASE, T.; ALDERMAN, J.; INATOMI, N.; LIEBER, C.S. Role of xantine oxidase in ethanol-induced lipid peroxidation in rats. **Gastroenterology**, 9(1):203-210, 1990.

KAUR, S.; RYBICKI, L.; BACON, B.R.; GOLLAN, J.L.; RUSTGI, V.K.; CAREY, W.D. Performance characteristics and results of a large - scale screening program for viral hepatitis and risk factors associated with exposure to viral hepatitis B and C: results of the national hepatitis screening survey. **Hepatology**, 24:979-985, 1996.

KEIDING, S. - Galactose clearance mensuraments and liver blood flow. **Gastroenterology**, 94(2):477-481, 1988.

KHAMBATTA, R.B. Metronidazole in giardiasis. **Ann. Trop. Med. Parasitol.**, 65(4):787-789, 1971.

- KHORUTS, A.; STAHNKE, L.; MCCLAIN, C.J.; LOGAN, G.; ALLEN, J.I. - Circulating tumor necrosis factor, interleukin-1 and interleukin-6 concentrations in chronic alcoholic patients. **Hepatology**, 13(2):267-276, 1991.
- KIYOSAWA, K.; SODEYAMA, T.; TANAKA, E.; GIBO, Y.; YOSHIZAWA, K.; NAKANO, Y.; FURUTA, S.; et al. - Interrelationship of blood transfusion, Non A, non B hepatitis and hepatocellular carcinoma : analysis by detection of antibody to hepatitis C virus. **Hepatology**, 12(4):671-675, 1990.
- KLASSEN, L.W.; TUMA, D.; SORREL, M.F. - Immune mechanisms of alcohol-induced liver disease. **Hepatology**, 22(1):355, 1995.
- KORETZ, R.L.; ABBEY, H.; COLEMAN, E.; GITNICK, G. - Non A, non B post transfusion hepatitis, looking back in the second decade. **Ann. Intern. Med.**, 119(2):110-115, 1993.
- KOTAKE, A.N.; SCHOELLE, D.A.; LAMBERT, G.H.; BAKER, A.L.; SCHAFFER, D.D.; JOSEPHS, H. - The caffeine CO₂ breath test. Dose response and route of N-demethylation in smokers and non smokers. **Clin. Pharmacol. Ther.**, 32(2):261-269, 1982.
- KREISBERG, R.A.; OWEN, W.C.; SIEGAL, A.M. - Ethanol-induced hyperlactacemia: inhibition of lactate utilization. **J. Clin. Invest.**, 50(1):166-174, 1971.

- LAU, A.H.; LAM, N.P.; PISCITELLI, S.C.; WILKES, L.; DANZINGER, L.H. - Clinical pharmacokinetics of metronidazole and other nitroimidazole anti-infectives. **Clin. Pharmacokinet.**, **23**(5):328-364, 1992.
- LE, J. & VIL CEK, J. - Tumor necrosis factor and interleukin-1: cytokines with multiple overlapping biological activities. **Lab. Invest.**, **56**(3):234-248, 1987.
- LEEVY, C.M. & LEEVY, C.B. Liver disease in the alcoholic. **Gastroenterology**, **105**:294-296, 1993.
- LEX, B.W.; ELLINGBOL, J.E.; TEOH, S.K.; MENDELSON, J.H.; RHOADES, E. Prolactin and cortisol levels following acute alcohol challenges in women with and without a family history of alcoholism. **Alcohol**, **8**(5):383-387, 1991.
- LIEBER, C.S. - Alcohol, protein metabolism, and liver injury. **Gastroenterology**, **79**(2):373-390, 1980.
- LIEBER, C.S. - Alcohol and Liver: 1984 update. **Hepatology**, **4**(6):1243-1260, 1984.
- LIEBER, C.S. Metabolism and metabolic effects of alcohol. **Med. Clin. North. Am.**, **68**(1):3-31, 1984.
- LIEBER, C.S. - Metabolic effects of acetaldehyde. **Biochem. Soc. Trans.**, **16**(3): 241-247, 1988.

- LIEBER, C.S. Interaction of ethanol with drugs, hepatotoxic agents, carcinogens and vitamins. **Alcohol. Alcohol.**, **25**(213):157-176, 1990.
- LIEBER, C.S. Interaction of alcohol and other drugs and nutrients: Implications for the therapy of alcoholic liver disease. **Drugs**, **40**(suppl 3):23-44, 1990.
- LIEBER, C.S.; DECARLI, L.M.; MAK, K.M.; KIM, C.I.; LEO, M.A. - Attenuation of alcohol-induced hepatic fibroses by polyunsaturated lecithin. **Hepatology**, **12**(6):1390-1398, 1990.
- LIEBER, C.S. - Alcoholic Liver disease: a public health issue in need of a public health approach. **Semin. Liver Dis.**, **13**(2):105-110, 1993.
- LIEBER, C.S. - Alcohol and the liver: 1994 update. **Gastroenterology**, **106**(4):5-1105, 1994.
- LIEBER, C.S.; ROBINS, S.J.; LI, J.; DECARLI, L.M.; MAK, K.M.; FASULO, J.M.; LEO, M.A. - Phosphatidylcholine protects against fibrosis and cirrhosis in the baboon. **Gastroenterology**, **106**(1):152-159, 1994.
- LOEPER, J.; DESCATOIRE, V.; MAURICE, M; BEAUNE, P.; FELDMANN, G.; LARREY, D.; PESSAYRE, D. - Presence of functional cytochrome P450 on isolated rat hepatocyte plasma membrane. **Hepatology**, **11**(5):850-858, 1990.
- LOFT, S.; OTTON, S.U.; LENNARD, M.S.; TUCKER, G.T.; POULSEN, H.E. Characterization of metronidazole metabolism by human liver microsomes. **Biochem. Pharmacol.**, **41**(8):1127-1134, 1991.

- LUCAS, D.; LAMBOCUF, Y.; DE SAINT BLANQUAT, G.; MENEZ, J.F.
Ethanol - inducible cytochrome P₄₅₀ activity and increase in acetaldehyde bound to microsomes after chronic administration of ethanol. **Alcohol. Alcohol.**, **25**(4):395-400, 1990.
- LUNEL, F.; ABUAF, L.; GRIPPON, P.; PERRIN, M.; COS, Y.L.; VALECI, D.; BOROTTO, E.; YAMAMOTO, A.M.; HURAUX, J.M.; OPOLON, P.; HOMBERG, J.C. Liver / Kidney microsome antibody type 1 and hepatitis C virus infection. **Hepatology**, **16**(3):630-636, 1992.
- MA, X. L.; BARAONA, E.; HERNANDEZ - MUNOZ, R.; LIEBER, C.S. - High levels of acetaldehyde in nonalcoholic liver injury after threonine on ethanol administration. **Hepatology**, **10**(6):933-940, 1989.
- MA, X.L.; BARAONA, E.; LIEBER, C.S. - Alcohol consumption enhances fatty acid ω -oxidation, with a greater increase in male than in female rats. **Hepatology**, **18**(5):1247-1253, 1993.
- MADDREY, W.C. - Hepatic effects of acetaminophen. Enhanced toxicity in alcoholics. **J. Clin. Gastroenterol.**, **9**(2):180-185, 1987.
- MADDREY, W.C.; BOINOTT, J.K.; BEDINE, M.S.; WEBER, F.L.Jr.; MEZEY, E.; WHITE, R.I.Jr. Corticosteroide therapy of alcoholic hepatitis. **Gastroenterology**, **75**(2):193-199, 1978.

- MATSUDA, Y.; TAKADA, A.; TAKASE, S.; YASUHARA, M. - Effects of ethanol on the secretion of hepatic secretory protein in rat alcoholic liver injury. **Alcohol**, **8**(6):433-437, 1991.
- MATSUOKA, M.; TSUKAMOTO, H. - Stimulation of hepatic lipocyte collagen production by Kupffer cell - derived transforming growth factor β : implication for a pathogenetic role in alcoholic liver fibrogenesis. **Hepatology**, **11**(4):599-605, 1990.
- MAUCH, T.J.; DONOHUE, T.M. LETTERMAN, R.K.Jr.; SORRELL, M.F.; TUMA, D.J. - Covalent binding of acetaldehyde to lysine-dependent enzymes can inhibit catalytic activity. **Hepatology**, **5**(5):1056, 1985.
- MAUCH, T.J.; TUMA, D.J.; SORRELL, M.F. - The binding of acetaldehyde to the active site of ribonuclease: alterations in catalytic activity and effects of phosphate. **Alcohol**, **22**(2):103-112, 1987.
- MCCLAIN, C.; HILL, D.; SCHMIDT, J.; DIEHL, A.M. - Cytokines and alcoholic liver disease. **Semin. Liver Dis.**, **13**(2):170-182, 1993.
- MCGILVERAY, I.J.; MIDHA, K.K.; LOO, J.C.; COOPER, J.K. - The bioavailability of commercial metronidazole formulations. **Int. J. Pharmacol. Biopharm.**, **16**(3):110-115, 1978.
- MCLEAN, A.J. & MORGAN, D.J. - Clinical pharmacokinetics in patients with liver disease. **Clin Pharmacokinet**, **21**(1):42-69, 1991.

- MICHAEL, G.; RITTER, A.; GIRKEN, G.; BUSCHENFELDE, M.K.; DECKER, R.; MANNAS, P.M. - Anti-GOR and hepatitis C virus in autoimmune liver diseases. **Lancet**, **339**(8797):267-269, 1992.
- MICHALPOULOSS, G.K. - Liver regeneration: molecular mechanisms of growth control. **Faseb. J.**, **4**:176-187, 1991.
- MISHRA, L.; SHARMA, S.; POTTER, J.J.; MEZEY, E. More rapid elimination of alcohol in women as compared to their male siblings. **Alcohol. Clin. Exp. Res.**, **13**(6):752-754, 1989.
- MISHIRO, S.; HOSHI, Y.; TAKEDA, K.; YOSHIKAWA, A.; GOTANDA TOHRU; TAKAHASHI, K.; AKAHANE, Y.; YOSHIZAWA, H.; OKAMOTO, H.; TSUDA, F.; PETERSON, D.A.; MUCHMORE, E. Non A, non B hepatitis specific antibodies directed a host - derived epitope: implication for an autoimmune process. **Lancet**, **336**(8728):1400-1403, 1990.
- MONROE, P.; BAKER, A. KRAGER, P.; SCHOELLER, D.; KLEIN, P. - The aminopyrine breath test predicts histology and correlates with course in patients with chronic hepatitis. **Gastroenterology**, **78**(6):1314, 1980.
- MURPHY, R.; SWARTZ, R.; WATKINS, P.B. - Severe acetaminophen toxicity in a patient receiving isoniazid. **Ann. Intern. Med.**, **113**(10): 799-800, 1990.
- MURRAY, M. - P450 enzymes, inhibition mechanisms, genetic regulation and effects of liver diseases. **Clin. Pharmacokinet.**, **23**(2):132-146, 1992.

- MUSCARÁ, M.N.; PEDRAZZOLI, J.J.; MIRANDA, E.L.; FERRAZ, J.G.; ITOFSTATTER, E.; LEITE, G.; MAGALHÃES, A.F.; LEONARDI, S.; DE NUCCI, G. - Plasma hydroxy - metronidazole / metronidazole ratio in patients with liver disease and in healthy volunteers. **Br. J. Clin. Pharmacol.**, 40(5):477-480, 1995.
- NAZARETH, H.M.; REGE, N.N.; NAYAK, V.K.; DESCU, N.M.; SOMESHWAR, V.; DAHANUKAR, S.A.; BAPAT, R.D. - Antipyrine clearance: prognostic marker for obstructive jaundice. **Indian J. Gastroenterol.**, 9(1):63-66, 1990.
- NEBERT, D.W.; GONZALEZ, F.J. P450 genes: structure, evolution and regulation. **Ann. Rev. Biochem.**, 56:945-993, 1990.
- NEBERT, D.W.; NELSON, D.R.; COON M.J.; ESTABROOK, R.W.; FEYERIESEN, R.; FUJII-KURIYAMA Y.; GONZALEZ, F.J.; GUENGERICH, F.P.; GUNSALUS, F.C.; JONSON, E.F. - The P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping and recommended nomenclature. **DNA Cel. Biol.**, 10(1):1-14, 1991.
- NIEMELA, O.; JUVONEN, T.; PARKKILA, S. - Immunohistochemical demonstration of acetaldehyde - modified epitopes in human liver after alcohol consumption. **J. Clin. Invest.**, 87(4):1367-1374, 1991.
- O'KEEFE, J.P.; TROC, K.A.; THOMPSON, K.D. - Activitis of metronidazole and its hidroxy and acid metabolities aganist clinical isolates of anaerobic bacteria. **Antimicrob. Agents. Chemother.**, 22(3):426-430, 1982.

- OELLERICH, M.; RINGE, B.; GUBERNATIS, G.; BURDELSKIM, M.; LAMESCH, P.; BUZENDAHL, H.; PICHLMAYR, R.; HERMANN, H. - Lidocaine metabolite formation as a measure of pretransplant liver function. **Lancet**, **1**(8639):640-642, 1989.
- OELLERICH, M.; SCHUTZ, E.; POLZIEN, F.; RING, B.; ARMSTRONG, V.W.; HARTMANN, H.; BURDELSKI, M. - Influence of gender on the monoethylglycinexylidide test in normal subjects and liver donors. **Ther. Drug Monit.**, **16**(3):225-231, 1994.
- OGATA, N.; ALTER, H.J.; MILLER, R.H.; PURCELL, R.N. - Nucleotide sequence and mutation rate of the H strain of hepatitis C virus. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, **88**(8):3392-3396, 1991.
- PALMER, K.R.; JENKINS, W.J. - Aldehyde dehydrogenase in alcoholic subjects. **Hepatology**, **5**(2):260-263, 1985.
- PARÉS, A.; BARRERA, J.M.; CABALLERIA, J.; ERCILLA, G.; BRUGUERA, M.; CABALLERIA, L.; CASTILLO, R.; RODES, J. - Hepatitis C virus antibodies in chronic alcoholic patients: association with severity of liver injury. **Hepatology**, **12**(6):1295-1299, 1990.
- PEQUIGNOT, G.; TUYNS, A.J.; BERTA, J.L. - Ascitic cirrhosis in relation to alcohol consumption. **Int. J. Epidemiol.**, **7**(2):113-120, 1978.

- POWELL, S.J.; MACLEOD, I.; WILMOT, A.J.; ELSDON-DEW, R.
Metronidazole in amoebic dysentery and amoebic liver abscess. **Lancet**,
2(477):1329-1331, 1966.
- POWELL, W.J.; KLATSKIN. - Duration of survival in patients with Laennec's
cirrhosis. **Am. J. Med.**, 44:406-420, 1968.
- PRICHARD-DAVIS, R.; GROSS, A.S.; SHENFIELD, G.M. - The effect of liver
disease and food on plasma MEGX concentrations. **Br. J. Clin. Pharmacol.**,
37(3):298-301, 1994.
- PRIETO, M.; OLASO, V.; VERDU, C.; CÓRDOBA, J.; GISBERT, C.; RAYÓN,
M.; CARRASCO, D.; BERENGUER, M.; HIGÓN, M.D.; BERENGUER, J. -
Does the healthy hepatitis C virus carrier state really exist? An analysis using
polymerase chain reaction. **Hepatology**, 22(2):413-417, 1995.
- RAYSSIGUIER, Y.; CHEVALIER, F.; BONNET, M.; KOPP, J.; DURLACH, J.
Influence of magnesium deficiency on liver collagen after carbon tetrachloride
and ethanol administration on rats. **J. Nutr.**, 115(12):1656-1662, 1985.
- REINKE, L.A.; RAU, J.M.; MACCAY, P.B. - Possible roles of the free radicals in
alcoholic tissue damage. **Free Radic. Res. Commun.**, 9(316):205-211,
1990.
- RENNER, E.; WIETHOLZ, H.; HUGUENIN, P.; ARNAUD, M.J.; PREISIG, R. -
Caffeine: a model compound of measuring liver function. **Hepatology**,
4(1):38-46, 1984.

- RODRÍGUEZ-RODRIGUEZ, E.; GONZALEZ-REIMERS, E.; SANTOARIA-FERNÁNDEZ, F.; MILENA-ABRIL, A.; RODRIGUEZ-MORENO, F.; ORAMAS-RODRÍGUEZ, J.; MARTINEZ-RIERA, A. Cytokine levels in acute alcoholic hepatitis: a sequential study. **Drug alcohol depend.**, 39(1):23-27, 1995.
- ROSENBLATT, J.E.; RANDALL, S.E. - Metronidazole. **Mayo Clin. Proc.**, 62(11):1013-1017, 1987.
- ROSMAN, A.S. & HIELER, C.S. - Diagnostic utility of laboratory tests in alcoholic liver disease. **Clin. Chem.**, 40(8):1641-1651, 1994.
- ROSMAN, A.S.; PARONETTO, F.; GALVIN, K.; WILLIAMS, R.J.; LIEBER, C.S. Hepatitis C virus antibody in alcoholic patients: association with the presence of portal and/or lobular hepatitis. **Arch. Intern. Med.**, 153(8):965-969, 1993.
- RUBIN, E. & LIEBER, C.S. - Alcohol induced hepatic injury in monoalcoholic volunteers. **N. Engl. J. Med.**, 278(16):869-876, 1968.
- RYAN, D.E.; KOOP, D.R.; THOMAS P.E.; COON, M.J.; LEWIN, W. - Evidence that isoniazid and ethanol induce the same microsomal cytochrome P450 in rat liver, an isozyme homologous to rabbit liver cytochrome P450 isoenzyme 3a. **Arch. Biochem. Biophys.**, 246(2):633-644, 1986.

- SANDERSON, N.; FACTOR, V.; NAGY, P.; KOOP, J.; KONDAIAH, P.; WAKEFIELD, L.; ROBERTS, A.B.; SPORN, M.B.; THORGEIRSSON, S.S. - Hepatic expression of mature transforming growth factor β 1 in transgenic mice results in multiple tissue lesions. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, 92(7):2572-2576, 1995.
- SAUNDERS, J.B.; WALTERS, J.R.F.; DAVIES, P.; PATON. A 20-year prospective study of cirrhosis. **Br. Med. J.**, 282(6210):263-266, 1981.
- SCHEUER, P.J.; ASHRAFZADEH, P.; SHERLOCK, S.; BROWN, D.; DUSHEIKO, G.M. The pathology of hepatitis C. **Hepatology**, 15(4):567-571, 1992.
- SHIFFMAN, M.L.; LUKETIC, V.A.; SANYAL, A.J.; DUCKWORTH, P.F.; PURDLEM, P.P.; CONTOS, M.J.; MILLS, A.S.; EDINBORO, L.E.; POKLIS, A. - Hepatic lidocaine metabolism and liver histology in patients with chronic hepatitis and cirrhosis. **Hepatology**, 19(4):933-940, 1994.
- SCHNABEL, R.; JASZOVSKY, S.; BOKOR, M.; GARAM, T. - Serum aminoterminal type III procollagen peptide level and killer cell activity in patients with alcoholic liver diseases . **Orv. Hetil.**, 132(27):1479-1483, 1991.
- SCHUCKIT, M.A.; GOLD, E.; RISCH, C. - Plasma cortisol levels following ethanol in sons of alcoholics and controls. **Arch. Gen. Psychiatry**, 44(11):942-945, 1987.
- SCHUCKIT, M.A.; GOLD, E.; RISCH, C. - Serum prolactin levels in sons of alcoholics and control subjects. **Am. J. Psychiatry**, 114(7):854-859, 1987.

- SEITZ, H.K.; EGERER, G.; SIMANOWSKI, U.A.; WALDHERR, R.; ECKEY, R.; AGARWAL, D.P.; GOEDDE, H.W.; VON WARTBURG, J.P. - Human gastric alcohol dehydrogenase activity: effect of age, gender and alcoholism. **Gut**, **34**(10):1433-1437, 1993.
- SHAKIL, A.O.; CONRY-CANTELENA, C.; ALTER, H.J.; et al.- Volunteer blood donors with antibody to hepatitis C virus: clinical, biochemical, virological and histological features. **Ann. Intern. Med.**, **123**(5):330-337, 1995.
- SHANK, W.A. JR. & AMERSON, A.B. - Metronidazole: an update of its expanding role in clinical medicine. **Hospital Formulations**, **16**:283-297, 1981.
- SHAW, S.; JAYATILLEKE, E.; ROSS, W.A.; GORDON, E.R.; LIEBER, C.S. - Ethanol induced lipid peroxidation: potentiation by long term alcohol feeding and alternation by methionine. **J. Lab. Clin. Med.**, **98**(3):417-425, 1981.
- SHAW, S. & JAYATILLEKE, E. The role of cellular oxidase and catalytic iron in the pathogenesis of ethanol - induced liver injury. **Life Sci.**, **50**(26):2045-2052, 1992.
- SHAW, S. & JAYATILLEKE, E. - The role of aldehyde oxidase in ethanol-induced hepatic lipid peroxidation in the rat. **Biochem. J.**, **268**(3):579-583, 1990.

- SHELMET, J.J.; REICHARD, G.A.; SKUTCHES, C.L.; HOELDTKE, R.D.; OWEN, O.E.; BODEN, G. - Ethanol causes acute inhibition of carbohydrate, fat and protein oxidation and insulin resistance. **J. Clin. Invest.**, **81**(4):1137-1145, 1988.
- SHERLOCK, S. & DOOLEY, J. - Alcohol and the liver. In:_____ - **Diseases of the liver and biliary system**. 9 ed. London, Blackwell Scientific Publications, 1992. p.370-389.
- SHERLOCK, S. European livers. **Lancet** **342**(8880):1127-1128, 1993.
- SHIFFMAN, M.L.; FISCHER, R.A.; SANYAL, A.J.; EDINBORO, L.E.; LUKETIC, V.A.; PURDUM III, P.P.; RAYMOND, P.; POSNER, M.P. - Hepatic lidocaine metabolism and complication of cirrhosis. Implications for assessing patient priority for hepatic transplantation. **Transplantation**, **55**(4):830-835, 1992.
- SHINDO, M.; ARAI, K.; SOKAWA, Y.; OKUNO, T. - The virological and histological status of anti-hepatitis C virus positive subjects with normal liver biochemical values. **Hepatology**, **22**(2):418-425, 1995.
- SHINN, D.L.S. - Metronidazole in acute ulcerative gingivitis. **Lancet** **1**:1191, 1962.
- SHIRATORI, Y.; TCHIDA, T.; KAWASE, T.; WISSE, E. - Effect of acetaldehyde on collagen synthesis by fat storing cells isolated from rats treated with carbon tetrachloride. **Liver**, **6**(4):246-251, 1986.

SHULL, M.M.; ORMSBY, I.; KIER, A.B.; PAWLOWSKI, S.; DIEBOLD, R.J.;
YIN, M.; ALLEN, R.; SIDMAN, C.; PROETZEL, G.; ANNUNZIATA, N.;
DUIETSCHAMAN, T. - Targeted disruption of the mouse transforming
growth factor- β gene results in multifocal inflammatory disease. **Nature**,
359(6397):693-699, 1992.

SILINI, E.; BONO, F.; CIVIDINI, A.; CERINO, A.; BRUNO, S.; ROSSI, S.;
BELLONI, G.; BRUGNETTI, B.; CIVARDI, E.; SALVANESCHI, L. -
Differential distribution of hepatitis C virus genotypes in patients with and
without liver function abnormalities. **Hepatology**, **21**(2):285-290, 1995.

SIMMONDS, P.; HOLMES, E.C.; CHAN, T.A.; CHAN, S.W.; MC OMISH, F.;
IRVINE, B.; BEALL, E.; YAP, P.L.; KOLBERG, J.; URDEA, M.S. -
Classification of hepatitis C virus into fix major genotypes and a series of
subtypes by phylogenetic analisys of the NS-5 region. **J. Gen. Virol.**
74(11):2391-2399, 1993.

SITZMANN, F.C. & KALOUD, H. - Biokinetics of galactose in the homozygotes
and heterozygotes of both forms of galactosemia. **Clin. Chim. Acta**
72(3):343-351, 1976.

SKAK, C. & KEIDENG, S. - Methodological problems in the use of indocyanine
green to estimate hepatic blood flow and clearance in man. **Liver**, **7**(3):155-
162, 1987.

SOWELL, M.F. & TEIMA, D.J. - The functional implications of acetaldehyde
binding to cell constituents. **Ann. N.Y. Acad. Sci.**, **492**:50-62, 1987.

SUTKER, P.B.; GOIST, K.C.JR.; KING, A.R. - Acute alcohol intoxication in women: relationship to dose and menstrual cycle phase. **Alcohol Clin. Exp. Res.** **11**(1):74-79, 1987.

TAKAHASKI, T.; KAMIMURA, T.; ICHIDA, F. - Ultrastructural findings on polymorphonuclear leucocyte infiltration and acute hepatocelular damage in alcoholic hepatitis. **Liver** **7**(6):347-358, 1987.

TANAKA, E.; KIYOSAWA, K.; SODEYAMA, T.; NAKANO, Y.; YOSHIZAWA, K.; HAYATA, K.; SHIMIZU, S.; NAKATSUJI, Y.; KOIKEY, FURUTA, S. - Significance of antibody to hepatitis C virus in Japanese patients with viral hepatitis: relationship between anti-HCV antibody and prognosis of non A non B post transfusion hepatitis. **J. Med. Virol.**, **33**(2): 117-122, 1991.

TAPNER, M.; LIDDLE, C.; GOODWIN, B.; GEORGE, J.; FARRELL G.C. - Interferon gamma down-regulates cytochrom P450 genes in primary cultures of well-differenciaded rat hepatocytes. **Hepatology**, **24**(2):367-373, 1996.

THAL, C.; EL KAHWAJI, J.; LOEPER, J.; TINEL, M.; DOOSTZADEH, J.; LABBE, G.; LACLAIRE, J.; BEAUNE, P.; PESSAYRE, D. - Administration of high doses of human recombinant interleukin 2 decreases the expression of several cytochrom P450 in rat. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, **268**(1): 515-521, 1993.

TSUKAMOTO, H.; GAAL, K.; FRENCH, S.W. - Insigths into the pathogenesis of alcohol liver necrosis and fibrosis: status report. **Hepatology**, **12**:599-608, 1990.

- TSUTSUMI, M.; LASKER, J.M.; SHIMIZU, M.; ROSMAN, A.S.; LIEBER, C.S.
The inducible P450 2E1 in rat and human liver. **Hepatology**, **10**(4):437-446,
1989.
- TUMA, D.J.; HOFFMAN, T.; SORREL, M.F. - The chemistry of acetaldehyde -
protein adducts. **Alcohol Alcohol Suppl.**, **1**:271-276, 1991.
- TUMA, D.J.; SMITH, S.L.; SORREL, M.F. - Acetaldehyde and microtubules.
Ann. N.Y. Acad. Sci., **625**:786-792, 1991.
- TYGSTRUP, N. - Determination of hepatic galactose elimination capacity after a
single intravenous injection in man. **Acta Physiol. Scand.**, **58**:162-172,
1963.
- TYGSTRUP, N. - Determination of the hepatic elimination capacity of galactose
by single injection. **Scand. J. Clin. Lab. Invest. Suppl.**, **18**:118-125, 1966.
- VAN THIEL, D.H.; LIPSITZ, H.D.; PORTER, L.E.; SCHADE, R.R.; GOTTIEB,
G.P.; GRAHAM, T.O. - Clinical Conference: Gastrointestinal and hepatic
manifestations of chronic alcoholism. **Gastroenterology**, **81**(3):594-615,
1981.
- VESTAL, R.E.; MCGUIRE, E.; TOKIN, J.D.; ANDRES, R.; NORRIS,
A.H.; MEZEY, E. - Aging and ethanol metabolism. **Clin. Pharmacol.
Ther.**, **21**(3):343-354, 1976.

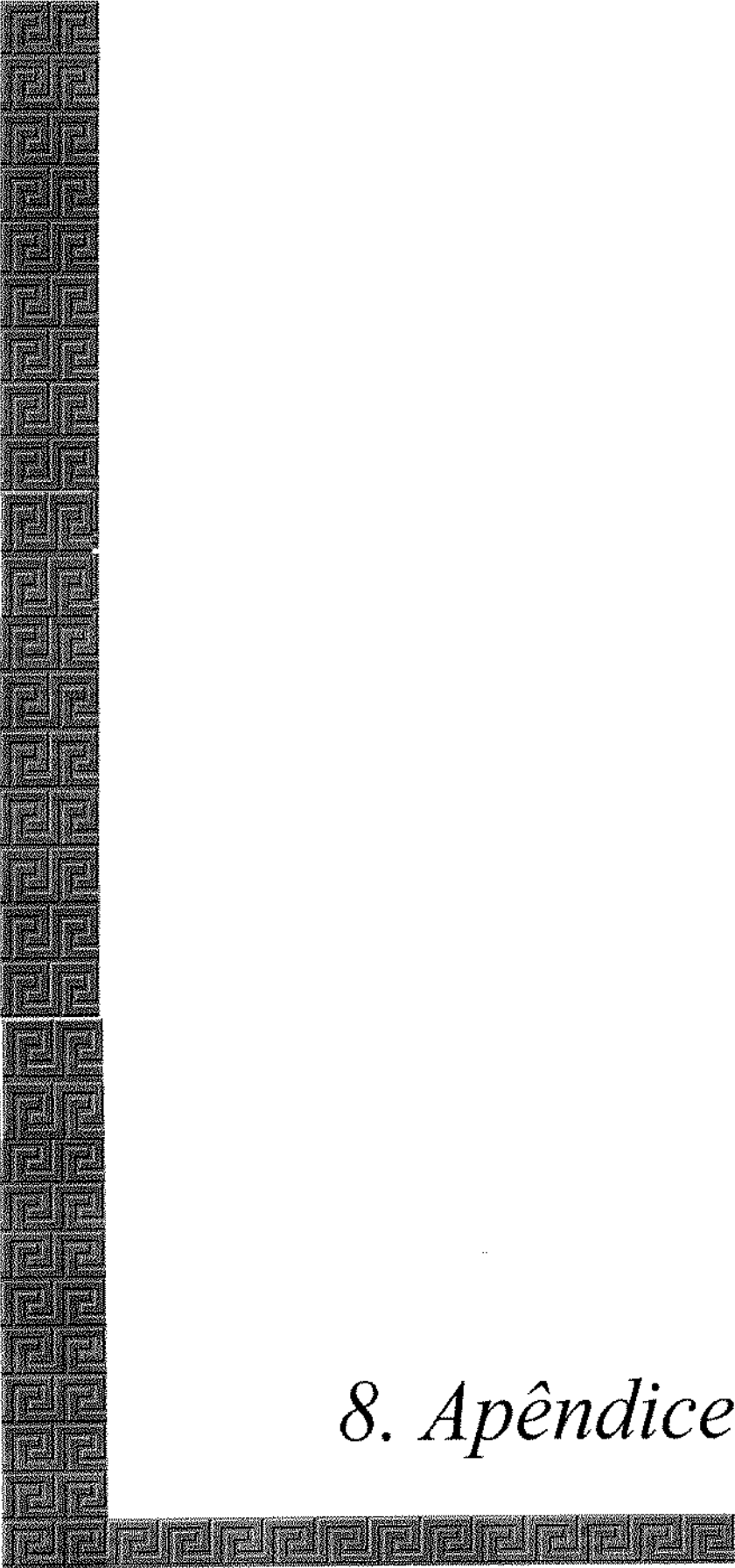
- WAHLLAENDER, A.; RENNER, E.; PREISIG, R. - Fasting plasma caffeine concentration. A guide to the severity of chronic liver disease. **Scand. J. Gastroenterol.** 20(9):1133-1141, 1985.
- WALLACE, P.; CUTLER, S.; HAINES, A. Randomised controlled trial of general practitioner intervention in patients with excessive alcohol consumption. **B.M.J.**, 297(6649):663-668, 1988.
- WALSH, D.C.; HINGSON, R.W.; MERRIGAN, D.M.; LEVENSON, S.M.; CUPPLES, L.A.; HEERENT, T.; GOLFFMAN, G.A.; BECKER C.A.; BAKER, T.A.; HAMILTON, S.K. - A randomized trial of treatment options for alcohol-abusing workers. **N. Engl. J. Med.**, 325(11):775-782, 1991.
- WANG, T.T.; KLEBER, G.; STELLAARD, F.; PAUMGARTNER, G. - Caffeine elimination: a test of liver function. **Klin. Wochenschr.**, 63(21):1124-1128, 1990.
- WANG, T.T.; FARRES, J.; WEINER, H. - Liver mitochondrial aldehyde dehydrogenase in vitro expression, in vitro import, and effect of alcohols on import. **Arch. Biochem. Biophys.**, 272(2):440-449, 1989.
- WANG, T.T.; PAK, Y.K.; WEINER, H. - Effects of alcohol on the import of aldehyde dehydrogenase precursor into rat liver mitochondria. **Alcohol Clin. Exp. Res.** 14(4):600-604, 1990.
- WATKINS, P.B. - Role of cytochromes P450 in drug metabolism and hepatotoxicity. **Sem. Liver Dis.** 10(4):235-250, 1990.

- WAXMAN, D.J.; LAPENSON, D.P.; KRISHNAN, M.; BERNARD, O.; KREIBICH, G.; ALVAREZ, F. - Antibodies to liver/kidney microsomes 1 in chronic active hepatitis recognize specific forms of hepatic cytochrome P450. **Gastroenterology** 95(5):1326-1331, 1988.
- WEINER, A.J.; GEYSEN, H.M.; CHRISTOPHERSON, C.; HALL, J.E.; MASON, T.J.; SAIACCO, G.; BONINO, F.; CRAWFORD, K.; MAUON, C.D.; CRAWFORD, K.A. - Evidence of immune selection of hepatitis C virus putative envelope glycoprotein variants: potential role in chronic HCV infections. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, 89(8):3468-3472, 1992.
- WEINER, F.R.; ESPOSITI, S.D.; ZERN, M.A. - The regulation of hepatic matrix protein synthesis by cytokines. In : Clement B, Guillozo A. **Cellular and molecular aspects of cirrhosis**. John Libbey Eurotech, 1992. p.147-156.
- WEINER, F.R.; GIAMBRONE, M.A.; CZAJA, M.J.; SHAH, A.; ANNONI, G.; TAKAHASHI, S.; ZERN, M.A. - Ito cell gene expression and collagen regulation. **Hepatology**, 11(1): 111 - 117, 1990.
- WILKINSON, G.R.; SHAND, D.G. - Commentary: a physiological approach to hepatic drug clearance. **Clin. Pharmacol. Ther.**, 18(4): 377-390, 1975.
- WILLIAMS, R.L. - Drug administration in hepatic disease. **N. Engl. J. Med.**, 309(6): 1616-1622, 1983.
- WOODS, S.E.; HITCHCOCK, M.; MEYER, A. Alcoholic Hepatitis. **Am. Fam. Physician**, 47(5):1171-1178, 1993.

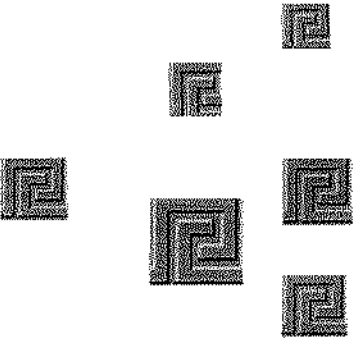
WORRALL, S.D.E.; JERSEY, J.; SHANLEY, B.C.; WILCE, P.A. - Antibodies against acetaldehyde-modified epitopes: presence in alcoholic, non alcoholic liver disease and control subjects. **Alcohol. Alcohol.**, **25**(5):509-517, 1990.

YOUSUF, M.; NAKANO, Y.; TANAKA, E.; SODEYAMA, T.; KIYOSAWA, K. - Persistence of viremia in patients with type - C chronic hepatitis during long term follow-up. **Scand. J. Gastroenterol.**, **27**(9):812-816, 1992.

YUKI, N.; HAYASHI, N.; KAMADA, T. - HCV viraemia and liver injury in symptom-free blood donors [letter]. **Lancet**, **342**(8868):444, 1993.



8. *Apêndice*



Windows95

De: Geoffrey Edwards[SMTP:ge1000@liverpool.ac.uk]
Enviada em: Terça-feira, 19 de Agosto de 1997 13:34
Para: Jose Pedrazzoli
Assunto: Manuscript for BJCP...

Dear Dr Pedrazzoli,

I have today received your manuscript 'Plasma hydroxy-metronidazole/metronidazole ratio in anti-HCV carriers with and without liver disease. I have passed it on to the Editorial Secretaries for their consideration.

Note that all manuscripts must first be sent to London where an Executive Editor (possibly me but not necessarily so) is assigned. This is explained in the 'Instructions to Authors' located inside the back cover of the journal.

You will receive an acknowledgement from London in due course.

Best regards,

Sincerely yours,

Dr I G Edwards

=====

=====

Dr Geoffrey Edwards
Department of Pharmacology and Therapeutics
Ashton Street Medical School
The University of Liverpool
LIVERPOOL L69 3GE
United Kingdom

Tel 00 44 151 794 5552/5545
FAX 00 44 151 794 5540

e-mail ge1000@liverpool.ac.uk

Plasma hydroxy metronidazole/metronidazole ratio in anti-HCV carriers with and without apparent liver disease.

C.M.F. da Silva¹, F.L. David¹, M.N. Muscará¹, S.S. Sousa¹, J.G.P. Ferraz², G. de Nucci³, N. C. Polimeno⁴, J. Pedrazzoli Jr.¹

¹Clinical Pharmacology Unit, São Francisco University Medical School, Bragança Paulista, SP; ²Miguel Servet Clinical Pharmacology Unit, Department of Pharmacology, Faculty of Medical Sciences, UNICAMP, Campinas, SP; ³Department of Pharmacology, Institute of Biomedical Sciences, São Paulo University, São Paulo, SP; ⁴Hemocentro, São Francisco University Medical School, Bragança Paulista, SP, Brazil.

Author for correspondence:

Prof. Dr. José Pedrazzoli Júnior,
Clinical Pharmacology Unit,
São Francisco University Medical School,
Av. São Francisco de Assis, 218
12900-000, Bragança Paulista, SP, Brazil.
Fax: +55-11-78441825
e-mail: pedrazz@dglnet.com.br

ABSTRACT

Aims: To evaluate plasma hydroxy-metronidazole/metronidazole ratio as a dynamic liver function test in HCV-infected individuals with/without liver disease, in the absence of liver cirrhosis. **Methods:** Metronidazole was intravenously administered for 20 min to healthy volunteers, asymptomatic anti-HCV-positive blood donors, and to chronic hepatitis C patients. Serology to HCV was determined by a second generation assay and confirmed by gelatin particle agglutination test using recombinant antigens C22-3 and C200. Plasma concentration of metronidazole and hydroxy-metronidazole was measured by high performance liquid chromatography in samples collected 5, 10, 20 and 30 min following the end of metronidazole infusion. **Results:** Chronic hepatitis C patients had abnormal liver enzymes, while healthy volunteers and anti-HCV-positive blood donors had normal liver biochemistry tests. Plasma metronidazole concentration was similar in all groups studied. Plasma hydroxy-metronidazole/metronidazole ratio was significantly reduced in HCV-infected subjects, an effect observed 10 min after the end of drug infusion. **Conclusions:** Metronidazole clearance is impaired in anti-HCV-positive blood donors and chronic hepatitis C patients, indicating that HCV is capable of affecting liver function at early stages of the disease. The metronidazole clearance test can detect impaired liver function in HCV-infected individuals even in the absence of liver cirrhosis.

Key words: *metronidazole clearance, liver function, hepatitis C, cytochrome P450, blood donors*

INTRODUCTION

Hepatitis C virus (HCV) is the predominant worldwide cause of post-transfusion and sporadic non-A, non-B hepatitis (1). Subclinical HCV infection is common, without patients reporting the acute illness associated with jaundice (2). Although the acute illness is usually mild, the most important feature of HCV infection is its tendency to become chronic, with increased risk of developing cirrhosis and hepatocellular carcinoma (3-4). It has been suggested that persistence of HCV infection is invariably associated with hepatic damage (5). However, there have been reports of anti-HCV positive individuals in which persistent HCV viraemia was not associated with abnormal liver chemistry (6). Therefore, considerable controversy exists regarding the existence of a true healthy HCV carrier state.

Dynamic liver function tests such as indocyanine green clearance (7), caffeine elimination (8) and lidocaine metabolism (9) have been used to complement standard liver assessment in patients with liver disease. Metronidazole clearance was recently proposed as a very sensitive method for evaluating liver function (10). It consists of measuring plasma hydroxymetronidazole/metronidazole ratio by high performance liquid chromatography (HPLC) following intravenous administration of a single dose of metronidazole. It assessed a decreased capacity of Child A cirrhotic patients to metabolize metronidazole compared to healthy individuals, indicating that detection of impaired liver function is possible in very early stages of liver cirrhosis (10).

Since the significance of anti-HCV positivity in asymptomatic blood donors is unclear with respect to liver disease, and the infection rate in this

group can be as high as 20% (11), evaluation of liver function in these individuals might prove useful in detecting subgroups of patients that could potentially develop liver injury. Therefore, the aim of this study was to evaluate the hepatic clearance of metronidazole in healthy anti-HCV positive blood donors, chronic HCV-hepatitis patients and in healthy volunteers. Using the plasma hydroxy-metronidazole/metronidazole ratio as a liver function test (10) we have assessed the impact of HCV infection on liver function in the absence of cirrhosis.

MATERIAL AND METHODS

Subjects

Three groups of subjects were studied: healthy volunteers, asymptomatic anti-HCV positive blood donors and patients with HCV-associated chronic hepatitis. All individuals gave their written informed consent prior to the study. The clinical protocol was approved by the Medical School Ethics Committee, and the study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki.

The healthy volunteers (males = 12, females = 3; median age = 32 years [range 19-48 years]; median weight = 72 kg [range 52-96 kg]) were determined following assessment of their medical history, absence of alcoholism, normal physical examination and laboratory tests, including negative serology for B and C hepatitis. Sixteen healthy, asymptomatic, consecutive anti-HCV positive blood donors (males = 14, females = 2; median age = 35 years [range 18-76 years]; median weight = 67 kg [range 45-74 kg]) were referred to our Gastroenterology Unit between 1993 and 1996 from the São Francisco University Hospital Blood Bank (Hemocentro-HUSF). They were tested for anti-HCV antibodies using a second generation enzyme immunoassay (ABBOT HCV EIA 2nd Generation, ABBOTT Laboratories Diagnostics Division, IL). All positive results were confirmed using a gelatin particle agglutination test with recombinant antigens C22-3 and C200 (Serodia-HCV, Fujirebio Inc., Japan). Anti-HCV positive blood donors were considered as healthy carriers if liver enzymes such as alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), alkaline phosphatase and gamma-glutamyl transpeptidase, were within the

normal reference range values. Each patient was tested in three different occasions with at least one month interval between tests.

Thirteen non-alcoholic, non-cirrhotic, HCV-associated chronic hepatitis patients (males=13; median age = 34 years [range 21-47 years]; median weight = 68 kg [range 50-113 kg]) were selected as having positive serum anti-HCV (as measured by EIA), persistently abnormal liver enzymes but absence of other forms of viral hepatitis (negative serology for HBV). When possible, chronic HCV hepatitis was confirmed histologically by percutaneous liver biopsy. Absence of liver cirrhosis was determined by clinical evaluation and ultrasonography.

Clinical laboratory analysis

Serum AST, ALT, alkaline phosphatase, γ -glutamyl transpeptidase, total bilirubin, prothrombin time, haematocrit and total/differential white cell counts were analyzed in all subjects.

Metronidazole metabolism rate determination

Metronidazole clearance test was performed as described previously (10). Briefly, metronidazole (Flagyl[®], 5 mg/ml; from Rhodia, SP, Brazil) was administered intravenously as a single infusion (100 ml) over 20 min. Blood samples (5 ml) from an antecubital vein were collected into EDTA-containing tubes before and 5, 10, 20 and 30 min following the end of drug infusion. The participants remained as outpatients at the Clinical Pharmacology Unit during the metronidazole administration and blood sampling. The blood samples were centrifuged at 2,000 g for 5 min and the plasma was separated and stored at -20°C until assayed for their metronidazole (MET) and the hydroxy metabolite (OHM) concentration by

HPLC, as previously described (10, 12). Individual MET and OHM concentration, as well as OHM/MET concentration ratio, was calculated and plotted as a function of time. The area under the OHM/MET ratio vs. time curve was calculated by applying the trapezoidal rule.

Statistical analysis

The results were expressed as mean $\pm$ SEM, unless otherwise stated. All the variables were analyzed by one-way ANOVA followed by the Student-Newman-Keuls test for multiple comparisons among groups. Statistical significance was proved when $p < 0.05$.

RESULTS

Blood analysis demonstrated that both healthy volunteers and asymptomatic anti-HCV-positive blood donors had liver enzyme levels, total bilirubin and prothrombin times within the reference values (Table 1). However, chronic hepatitis C patients had significantly elevated liver enzyme levels compared to both healthy volunteers and anti-HCV-positive blood donors, a positive indicative that this group of subjects had active liver disease (Table 1). However, these patients had normal total serum bilirubin and prothrombin time (Table 1). Alkaline phosphatase, hematocrit and total/differential white cell count were within the normal reference range in all subjects studied (data not shown). Following the metronidazole infusion, the rise in plasma metronidazole concentration was similar in all groups studied (Figure 1a), whilst plasma hydroxy-metronidazole concentration was significantly reduced in both anti-HCV-positive blood donors and chronic hepatitis C patients (Figure 1b). Assessment of plasma hydroxy-metronidazole/metronidazole ratio (fig. 1c), an index of liver function, demonstrated a significantly reduced capacity of anti-HCV-positive blood donors and chronic hepatitis C patients to metabolize intravenously infused metronidazole compared to healthy individuals, a phenomenon observed in samples collected 10 minutes following the end of metronidazole infusion (healthy volunteers = 0.069 ± 0.029 ; anti-HCV-positive blood donors = 0.044 ± 0.019 , CI -0.041-0.0085, $p < 0.01$; chronic hepatitis C patients = 0.033 ± 0.013 , CI -0.057-0.015, $p < 0.001$). This effect was also observed in samples collected at further time point.

DISCUSSION

Standard liver biochemistry tests are not useful for assessing hepatic function or predicting development of cirrhosis in chronic hepatitis patients (13). Although approximately 95% of HCV-infected individuals can be identified by second generation anti-HCV testing (EIA). This test however, is not useful in discriminating previous and presently active infection (14). More over, HCV is not always associated with liver injury. Since some HCV RNA-positive subjects have been described as having normal liver histology (6) and normal liver biochemistry tests (15). Further complicating this issue, it has been reported that individuals with detectable serum HCV RNA have indeed some degree of liver damage, despite producing normal liver enzymes (5, 16). Therefore, HCV-infected individuals can present with: 1. normal liver enzymes/ normal liver histology, 2. abnormal liver enzymes/normal histology, 3. normal liver enzymes/abnormal liver histology, and 4. abnormal liver enzymes/abnormal liver histology.

The development of HCV-associated cirrhosis is related to poor prognosis. An investigation of the factors that could predict which subset of HCV-infected patients will develop a more severe degree of liver injury in the future is required. Some previous studies have attempted to associate different HCV genotypes to long-term effects on liver histology (17-19). However, the effects of HCV infection on liver function have not been fully investigated. The present study evaluated the impact of HCV on metronidazole clearance in the absence of liver cirrhosis. We have previously demonstrated the diagnostic value of metronidazole clearance as a very sensitive, easy to perform, liver function test. This test is capable of discriminating Child A cirrhotic patients from healthy individuals (10). Our

present results indicate that metronidazole metabolism, as measured by the plasma hydroxy-metronidazole/metronidazole ratio following metronidazole infusion, is progressively impaired in anti HCV-positive blood donors and in chronic hepatitis patients when compared with healthy volunteers. These results suggest that HCV can determine significant abnormalities on liver function.

Metronidazole is extensively metabolized by, as yet, unidentified cytochrome P450 isozyme(s) (20), giving rise to two principal metabolites: the hydroxy metabolite (with about 65% of the pharmacological activity of metronidazole), and the inactive acetic acid metabolite. (21). Several viral and bacterial infections (22), as well as interferon-inducing agents (23) have been associated with impaired cytochrome P450-mediated drug metabolism. This has been attributed, at least in part, to cytokine release. Since interleukin-2 (24), interleukin-4 (25) and interferon gamma have been shown to down-regulate the expression and catalytic activities of cytochrome P450 enzymes and genes (26-27). Indeed, elevated levels of interleukin-2, interleukin-4, interleukin-10 and interferon gamma have been reported in chronic hepatitis C (28-29). Therefore, it is probable that an impaired P450-dependent metronidazole metabolism exists in HCV-infected patients.

The mechanisms involved in hepatocellular injury in chronic HCV infection remain unclear. HCV infection may affect the hepatocytes directly or as result of an abnormal immune response within the liver (30-31). HCV-related factors can potentially produce cytopathic effects, and are dependent on its replication and mutation rates, as well as by the infectious dose. The immune response is dependent on host factors, including age and

maturity of the immune system, local and systemic cytokine production, and humoral and cellular immune response (32). That the direct effects of HCV infection on hepatocytes is unlikely is supported by the observation that: a) a percentage of individuals with antibodies to HCV and HCV RNA positivity have normal liver enzymes with no (or minimal) histological findings; b) intrahepatic HCV RNA levels do not correlate with the degree of liver injury; and c) HCV healthy carriers and chronic hepatitis patients have similar virological characteristics (14, 33). On the other hand, a role for anti-HCV immune mediated liver cell damage have been suggested by immunohistochemical studies (34). It is believed that HCV is able to trigger aberrant autoreactivity to hepatocellular antigens (35-39). Moreover, autoantibodies produced during chronic hepatitis C are capable of recognizing several forms of P450 cytochrome enzymes described in the plasma membrane of human hepatocytes, the specific content of cytochrome P450 being 9% of that in microsomes. Such P450 cytochromes are functional and were recognized by anti-cytochrome P450 autoantibodies (40-43). Once again, this data raises the possibility of an autoimmunity-mediated interference with the metronidazole metabolizing cytochrome P450 enzyme in HCV-infected subjects.

We conclude that anti-HCV-positive healthy blood donors and chronic hepatitis C patients have impaired liver function, as determined by altered metronidazole metabolism. HCV infection can determine changes in liver function at early stages of the disease. This phenomenon does not seem to be associated with damaged hepatocytes, and we speculate that it is most likely related to cytokine-mediated down-regulation of cytochrome P450 and/or an autoimmune-mediated impairment of cytochrome P450

function. This suggests that HCV-infected individuals may have impaired cytochrome P450-dependent drug metabolism. The use of metronidazole clearance test in the follow-up of HCV-infected subjects might help in detecting those patients who may develop more severe degrees of liver injury.

REFERENCES

1. Kuo G, Choo QL, Alter HJ, et al. An assay for circulating antibodies to a major etiologic virus of human non-A, non-B hepatitis. *Science* 1989; 244: 359-362
2. Booth JCL, Brown JL, Thomas HC. The management of chronic hepatitis C virus infection. *Gut* 1995; 37: 449-54
3. Dusheiko GM. Hepatitis C virus. In: Pounder RE, ed. *Recent advances in Gastroenterology*. 9th ed. Edinburgh: Churchill Livingstone, 1992: 195-216
4. Alter MJ, Margolis HS, Krawczynsky K, et al. The natural history of community-acquired hepatitis C in the United States. *New Engl J Med* 1992; 327: 1899-905
5. Alberti A, Morsica G, Chemello L, et al. Hepatitis C viraemia and liver disease in symptom-free individuals with anti HCV. *Lancet* 1992; 340: 697-698
6. Brillianti S, Foli M, Gaiani S, et al. Persistent hepatitis C viraemia without liver disease. *Lancet* 1993; 341:464-65
7. Hartmann AI, Bircher H, Creutzfeld W. Superiority of the Child-Pugh Classification to quantitative liver function test for assessing prognosis of liver cirrhosis. *Scand J Gastroenterol* 1989; 24: 269-276
8. Wang T, Kleber G, Steelaard F, et al. Caffeine elimination: a test of liver function. *Klin Wochenschr* 1985; 63: 1124-128

9. Shiffman ML, Fisher RA, Sanyal AJ, et al. Hepatic lidocaine metabolism and complications of cirrhosis. Implications for assessing patient priority for hepatic transplantation. *Transplantation* 1992;55: 830-35
10. Muscará M.N., Pedrazzoli J.J., Miranda E.L., et al. Plasma hydroxy metronidazole / metronidazole ratio in patients with liver disease and in healthy volunteers. *Br J Clin Pharmacol* 1995; 40: 477-80
11. Saeed A, Al-Admawi A, Al-Rasheed A, et al. Hepatitis C virus infection in Egyptian volunteer blood donors in Riyadh. *Lancet* 1991; 338: 459-60
12. Muscará MN, *de Nucci G* 1991. Bioavailability of four pharmaceutical formulations of metronidazole tested on normal healthy volunteers. *Braz J Med Biol Res* 24: 1251-1260
13. Shiffman ML, Luketic VA, Sanyal AJ, et al. Hepatic lidocaine metabolism and liver histology in patients with chronic hepatitis and cirrhosis. *Hepatology* 1994; 19: 933-40
14. Shindo M, Arai K, Sokawa Y, et al. The virological and histological states of anti-Hepatitis C Virus-positive subjects with normal liver biochemical values. *Hepatology* 1995; 2: 418-425
15. Alberti A, Chemello L, Cavalletto D, et al. Antibody to hepatitis C virus and liver disease in volunteer blood donors. *Ann Intern Med* 1991;114: 1010-12
16. Esteban JI, Lopez-Talavera JC, Genesca J, et al. High rate of infectivity and liver disease in blood donors with antibodies to hepatitis C virus. *Ann Intern Med* 1991; 115: 443-49

17. Dusheiko G, Schmilovitz-Weiss H, Brown D, et al. Hepatitis C virus genotypes: an investigation of type-specific differences in geographic origin and disease. *Hepatology* 1994; 19: 13-18
18. Prati D, Capelli C, Zanella A, et al. Influence of different hepatitis C virus genotypes on the course of asymptomatic hepatitis C virus infection. *Gastroenterology* 1996; 110: 178-183
19. Zeuzem S, Franke A, Lee JH, et al. Phylogenetic Analysis of hepatitis C virus isolates and their correlation to viraemia, liver function tests, and histology. *Hepatology* 1996; 24: 1003-009
20. Loft S., Otton S.V., Lennard M.S., et al. Characterization of metronidazole metabolism by human liver microsomes. *Biochem Pharmacol* 1991; 41: 1127-1134
21. Haller. *In vitro* activity of the two principal oxidative metabolites of metronidazole against *Bacteroides fragilis* and related species. *Antimicrob Agents Chemother* 1982; 22: 165-166
22. Renton KW, Knickle LC. Regulation of hepatic cytochrome 450 during infectious disease. *Can J Physiol Pharmacol* 1990; 68: 777-81
23. Morgan ET, Norman CA. Pre-translational suppression of cytochrome P450 (IIC11) gene expression in rat liver after administration of interferon inducers. *Drug Metab Dispos* 1990; 18: 649-53
24. Thal C, El Kahwaji J, Loeper J, et al. Administration of high doses of human recombinant interleukin 2 decreases the expression of several cytochrome P450 in the rat. *J Pharmacol Exp Ther* 1993; 268: 515-21

25. Abdel-Razzak Z, Loyer P, Fautrel A, et al. Cytokines down-regulate expression of major cytochrome P450 enzymes in adult human hepatocytes in primary culture. *Mol Pharmacol* 1993; 44: 707-15
26. Tapner M, Liddle C, Goodwin B, et al. Interferon gamma down-regulates cytochrome P450 genes in primary cultures of well-differentiated rat hepatocytes. *Hepatology* 1996; 24: 367-73
27. Abdel -Razzak Z, Loyer P, Fautrel A, et al. Cytokines down-regulate expression of major cytochrome P450 enzymes in adult human hepatocytes in primary culture. *Mol Pharmacol* 1993; 44: 707-15
28. Cacciarelli TV, Martinez OM, Gish RG, et al. Immunoregulatory cytokines in chronic hepatitis C virus infection: pre- and posttreatment with interferon alpha. *Hepatology* 1996; 24: 6-9
29. Napoli J, Bishop GA, McGuinness PH, et al. Progressive liver injury in chronic hepatitis C infection correlates with increased intrahepatic expression of Th1-associated cytokines. *Hepatology* 1996; 24: 759-65
30. Cerny A, Chisari FV. Immunological aspects of HCV infection. *Intervirology* 1994; 37: 119-25
31. Gonzalez-Peralta RP, Davis GL, Lau JY. Pathogenetic mechanisms of hepatocellular damage in chronic hepatitis C. *J Hepatol* 1994; 21: 255-259
32. Battegay M. Immunity of hepatitis C virus: a further piece of the puzzle. *Gastroenterology* 1996; 24: 961-63
33. Shakil AO, Conry-Cantilena C, Alter HJ, et al. Volunteer blood donors with antibody to hepatitis C virus: clinical, biochemical virological and histological features. *Ann Intern Med* 1995; 123: 330-37

34. Mosnier JF, Scoazec JY, Marcelin P, et al. Expression of cytokine-dependent immune adhesion molecules by hepatocytes. *Gastroenterology* 1994; 107: 1457-68
35. Lunel F, Abuaf N, Frangeul L, et al. Liver/kidney microsome antibody type 1 and hepatitis C virus infection. *Hepatology* 1992; 16: 630-636
36. Tran A, Quaranta J-F, Benzaken S, et al. High prevalence of thyroid autoantibodies in a prospective series of patients with chronic hepatitis C before interferon therapy. *Hepatology* 1993; 18: 253-57
37. Michel G, Ritter A, Gerken G, et al. Anti-GOR and hepatitis C virus in autoimmune liver diseases. *Lancet* 1992; 339: 267-68
38. Lenzi M, Ballardini G, Fusconi M, et al. Type 2 autoimmune hepatitis and hepatitis C virus infection. *Lancet* 1990; 335: 258-59
39. Durant JM, Lefevre P, Harle JR, et al. Cutaneous vasculitis and cryoglobulinaemia type II associated with hepatitis C virus infection. *Lancet* 1991; 337:499-500
40. Loeper J, Descatoire V, Maurice M, et al. Cytochrome P450 in human hepatocyte plasma membrane: recognition by several autoantibodies. *Gastroenterology* 1993; 104: 203-16
41. Lunel F, Abuaf N, Frangeul L, et al. Liver / kidney microsome antibody type 1 and hepatitis C virus infection. *Hepatology* 1992; 16: 630-36
42. Waxman DJ, Lapenson DP, Krissnan M., et al. Antibodies to liver / kidney microsome in chronic active hepatitis recognize specific forms of hepatic cytochrome P450. *Gastroenterology* 1988; 95: 1326-31

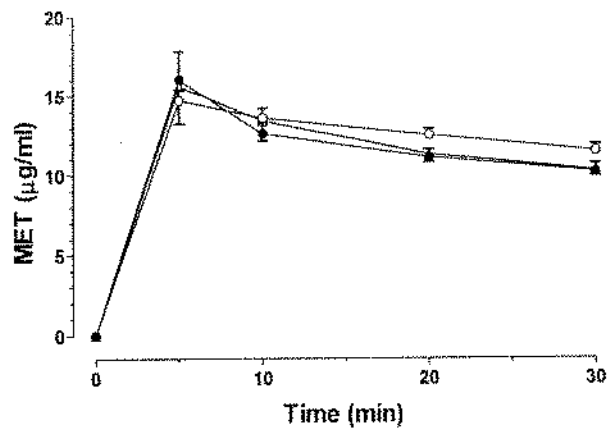
43. Manns MP, Griffin KJ, Sullivan KF, et al. LKM-1 autoantibodies recognize a short linear sequence in P450IID6, a cytochrome P450 Monooxygenase. *J Clin Invest* 1991; 88: 1370-78

Table I

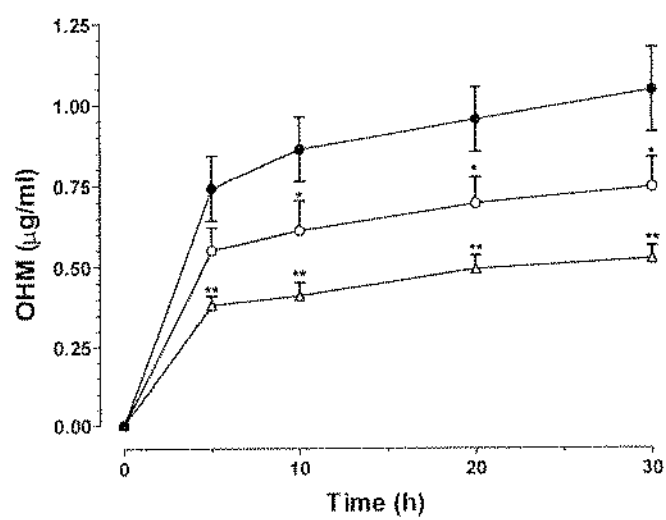
	Healthy Volunteer s	Anti-HCV + Blood Donors	Chronic HCV Patients
AST (IU/ml) normal (12-46 IU/ml)	17.1 ± 2.9	18.7 ± 0.9	72.3 ± 15.3 ^{***}
ALT (IU/ml) normal (3-50 IU/ml)	16.4 ± 2.6	19.3 ± 1.3	137.1 ± 39.3 ^{**}
γ-GT (IU/ml) normal (6-28 IU/ml)	22.2 ± 4.8	17.1 ± 2.7	57.5 ± 6.2 ^{***}
Total bilirubin (mg%) normal (<1.0 mg%)	0.88 ± 0.16	0.90 ± 0.12	1.15 ± 0.20
Prothrombin time (sec) control (13.5 sec)	13.5 ± 0.5	12.8 ± 0.2	12.9 ± 0.3

figure 1

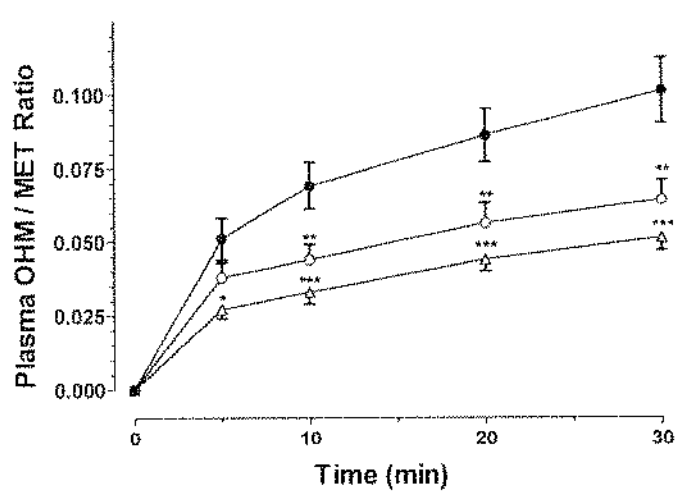
a)



b)



c)



LEGEND TO FIGURE

Mean $\pm$ SEM plasma concentration vs. time curves obtained for plasma MET (panel a), OHM (panel b) and OHM/MET ratio (panel c) from the three groups of subjects studied: healthy volunteers (solid circles), anti-HCV-positive blood donors (open circles) and chronic C-virus hepatitis patients (open triangles). Asterisks denote significant difference compared to healthy volunteers (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$).

LEGEND TO TABLE

Results of liver biochemistry tests from the three groups of subjects studied. There were no differences in total bilirubin and prothrombin time among the groups studied, while chronic hepatitis C patients had abnormal liver enzymes compared to healthy individuals and asymptomatic anti-HCV-positive blood donors. Asterisks denote significant differences compared to healthy volunteers (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$).