Rev Biomed 2011; 22:11-19

Artículo Original

Marcadores de daño oxidativo y defensa antioxidante en pacientes con hepatitis crónica C no respondedores al tratamiento con INF-α-PEG más ribavirina

Gretel Riverón-Forment[1], Eduardo Vilar-Gómez[2], Zuleika Calderín-Sollet[1], Yadina Martínez-Pérez[2], Nahomy Pérez-Sieres[1], Olivia Martínez-Bonne[1], Leyenis Valdés-Ramos[1]

[1] Laboratorio de Estrés Oxidativo, Centro Nacional de Genética Médica, La Habana, Cuba. [2] Instituto Nacional de Gastroenterología, La Habana, Cuba

RESUMEN

Introducción. En la hepatitis crónica por el virus C (HCC), se ha descrito que el estrés oxidativo puede ser un factor prominente en la inducción y la progresión de la enfermedad. Sin embargo, existen pocos reportes que evalúen estos marcadores en los pacientes afectados que no responden a la terapia convencional.

Objetivo. Evaluar el comportamiento de marcadores de daño oxidativo y defensa antioxidante en pacientes con HCC no respondedores a la terapia combinada estándar.

Materiales y Métodos. Se realizó un estudio descriptivo de tipo transversal. La muestra estuvo conformada por 27 pacientes con HCC, atendidos en el Instituto Nacional de Gastroenterología, durante el período comprendido entre octubre de 2008 y mayo de 2009, con edades comprendidas entre 26 y 64 años, de ambos sexos. Se utilizó como población de referencia un grupo conformado por 24 individuos aparentemente sanos, en el mismo rango de edad de los casos y de ambos sexos. Se evaluaron como marcadores de daño oxidativo a lípidos y proteínas, concentraciones plasmáticas de malonildialdehído y productos avanzados de la oxidación de proteínas. Además, se determinaron las actividades de las enzimas antioxidantes: Cu-Zn superóxido dismutasa, catalasa, glutatión peroxidasa y glutatión reductasa.

Resultados. Se observó un incremento significativo del daño oxidativo, así como en la actividad de las enzimas evaluadas.

Conclusiones. Estos hallazgos corroboran la participación del estrés oxidativo en la patogénesis de la HCC, en pacientes no respondedores a la terapia combinada estándar.

Palabras clave: virus de la hepatitis C, hepatitis crónica C, estrés oxidativo, daño oxidativo, enzimas antioxidantes

ABSTRACT

Oxidative damage and antioxidant defence markers in chronic hepatitis C patient who are non-responders to PEG-IFN-α2b plus ribavirin based therapy

Introduction. Oxidative stress may be a prominent factor in the induction and progression of Chronic Hepatitis C (CHC). However, there are few reports that evaluate these markers in non-responder patients.

Objective. The aim of this study was to determine some redox status markers in patients with CHC, who respond poorly to conventional therapy.

Materials and Methods. We performed a cross-sectional descriptive study. The sample consisted

Solicitud de sobretiros: Gretel Riverón-Forment, Jefe de Laboratorio de Estrés Oxidativo, Centro Nacional de Genética Médica, Ave. 31 No. 3102 esq. 146, Cubanacán, Playa, Ciudad de la Habana, Cuba. E-mail: gretel.riveron@infomed.sld.cu

Recibido: el 15 de abril de 2010. **Aceptado para publicación:** el 21 de febrero de 2011

Este artículo está disponible en http://www.revbiomed.uady.mx/pdf/rb112213.pdf

of 27 patients with CHC of both sexes, treated at the National Institute of Gastroenterology, in the period between October 2008 and May 2009, aged between 26 and 64 years. A reference population of 24 apparently healthy individuals of both sexes in the same age range of the study group were also tested. Samples were evaluated for markers of oxidative damage to lipids and proteins, malonildialdehyde, and advanced oxidation products of proteins. We also determined the activities of antioxidant enzymes: Cu-Zn superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase, and glutathione reductase.

Results. Our results showed that oxidative damage is higher in CHC patients who respond poorly to conventional antiviral therapy in comparison with the control group. In addition, we found an increase of antioxidant activity of evaluated enzymes in one group of patients.

Conclusions. These data demonstrate that oxidative damage and impairment of antioxidant defences was occurring in patients with chronic hepatitis C who respond poorly to standard therapy.

Key words: hepatitis C virus, chronic hepatitis C, oxidative stress, oxidative damage, antioxidants enzymes

INTRODUCCIÓN

La presencia de los radicales libres en el material biológico fue descubierta hace más de 50 años. En los reportes pioneros de Denham Harman, en 1956, se describen los radicales del oxígeno como compuestos capaces de provocar daños a los principales constituyentes celulares (1). De modo que el oxígeno es necesario para la vida, pero también es potencialmente dañino.

El estudio de los radicales libres en los organismos vivos entró en una segunda etapa después que McCord y Fridovich descubrieron la enzima superóxido dismutasa (2). Este hallazgo demostró que los organismos aerobios desarrollaron, durante su evolución, mecanismos bien conservados y estrategias para controlar la generación de estas especies químicas (3).

Los primeros reportes acerca de los efectos beneficiosos de los radicales libres dieron inicio a una tercera etapa. En este sentido, se ha descrito que las especies reactivas participan en procesos fisiológicos, desde el crecimiento y la proliferación hasta la diferenciación y la muerte celular, pasando por la transducción de señales intracelulares (4).

Hasta la fecha, se han descrito alteraciones en la regulación de los niveles de dichas especies en múltiples condiciones patológicas, entre las más citadas se encuentran la diabetes mellitus, el cáncer y las enfermedades neurodegenerativas; además, en otros procesos tales como la aterogénesis y la inflamación (4).

En la hepatitis crónica por el virus C (HCC), a diferencia de otras afecciones crónicas del hígado de etiología diferente, existen evidencias contundentes de que el estrés oxidativo (EO) es un factor prominente en la inducción y la progresión de la enfermedad.

La hepatitis por virus C (HVC) es una infección común a escala mundial, caracterizada en su evolución hacia la cronicidad, por un avance progresivo desde esteatosis hasta carcinoma hepatocelular, pasando por la fase crónica, la fibrosis y la cirrosis. Hoy en día, constituye un problema global de salud, ocupando el segundo lugar entre las infecciones virales crónicas más comunes, con una prevalencia mundial de alrededor de 180 millones de personas afectadas (5,6).

Si desde el descubrimiento del virus se han realizado grandes esfuerzos para entender el curso natural de la enfermedad, la voluntad de lograr una terapia eficaz ha sido mayor. El tratamiento actual con interferón alfa pegilado (INFα-PEG) más ribavirina no sólo revierte la fibrosis y previene el desarrollo de cirrosis y de carcinoma hepatocelular, sino que también mejora la calidad de vida de los pacientes. Sin embargo, se requieren de innovaciones futuras para tratar a aquellos individuos afectados que no logran responder con éxito a la terapia. En el momento

actual, son variados los fármacos en desarrollo que se encuentran en distintas fases de ensayo clínico. Se investigan fármacos que puedan ser eficaces bloqueando la entrada del virus de la hepatitis C (VHC) en la célula, inhibiendo enzimas como proteasas, polimerasas y ribonucleasas celulares, terapias basadas en ARN de interferencia, moléculas que bloquean el ensamblaje viral o que poseen actividad inmunomoduladora, análogos de la ribavirina sin acción anemizante y agentes con propiedades antioxidantes (7).

A pesar de que se han realizado múltiples estudios acerca de la relación del EO con la HCC, pocos autores se han concentrado en cómo se manifiesta esta situación en pacientes que no responden a la terapia convencional. Por esta razón y como parte de las investigaciones llevadas a cabo en nuestro país para abordar esta temática, se llevó a cabo el presente estudio, el cual sería el primer acercamiento al comportamiento de algunos indicadores de EO en este grupo de pacientes, con el objetivo futuro de proponer la utilización de suplementos nutricionales con propiedades antioxidantes como parte del tratamiento de estos pacientes.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se realizó un estudio descriptivo de tipo transversal. La muestra estuvo conformada por 27 pacientes con HCC, no respondedores al tratamiento estándar: INF α-PEG (180 µg/semanal x 48 semanas), ribavirina (1000 ó 1200 mg diarios en dependencia del peso x 48 semanas); atendidos en el Instituto Nacional de Gastroenterología (ING), en el período comprendido entre octubre de 2008 y mayo de 2009, con edades comprendidas entre 26 y 64 años, de ambos sexos. Los datos clínicos y de laboratorio de los pacientes se describen en el **Cuadro 1.**

Teniendo en cuenta la naturaleza comparativa de la situación de EO, contrastamos el comportamiento de estos marcadores con una población de referencia conformada por 24 individuos aparentemente sanos, en el mismo rango de edad de los casos (17 a 67 años) y de ambos sexos (12 hombres y 12 mujeres). Estas personas fueron previamente interrogadas y se les realizó un examen físico y estudios de laboratorio clínico (pruebas de función hepática, glicemia, creatinina, lipidograma y parámetros hematológicos), para descartar la presencia de otras enfermedades que pudieran relacionarse con el EO. Además, se constató la no utilización de suplementos antioxidantes y hábitos tóxicos como el consumo de alcohol y el tabaquismo.

Cuadro 1
Características clínicas y de laboratorio de los pacientes con HCC

Características de los pacientes	
Edad * (años)	47 ± 10.5
Género, n (%) Femenino Masculino	 23 (85.2%) 4 (14.8%)
Genotipo	100% genotipo 1
Enzimas hepáticas * (IU/L) ALAT ASAT	 67.9 ± 43.8 56.5 ± 41.1
Tiempo de evolución de la infección (años)	13.6 ± 8.3
HCV RNA > 600 000 IU/mL, n (%)	22 (81.5%)

* (Media ± desviación estándar). Los datos fueron proporcionados por el ING

Todos los participantes fueron incluidos luego de emitir voluntariamente su consentimiento, siguiendo los principios éticos de la Declaración de Helsinki de 1975, modificada en 2008; además, el protocolo de investigación fue revisado por los comités de ética médica de las instituciones participantes.

En este estudio, se utilizó como muestra biológica sangre venosa sistémica. La extracción se realizó en ayunas, mediante punción venosa

en el ING. Para las determinaciones de EO, se extrajeron 4 ml de sangre en un tubo con EDTA como anticoagulante. El plasma se separó por centrifugación (2500 rpm durante 5 minutos a 4°C) y se lavaron los eritrocitos 3 veces con solución de NaCl 0.9% fría. Posteriormente, se procedió a la lisis de un volumen conocido de eritrocitos con agua destilada fría (1:4). Una vez obtenido el lisado de eritrocitos, se determinó la concentración de hemoglobina y todas las muestras se almacenaron a -20ºC hasta la realización del ensayo.

Marcadores de daño oxidativo

1. Determinación de la concentración de malonildialdehído.

La concentración plasmática de malonildialdehído (MDA) se determinó a partir del método descrito en el ensayo BIOXYTECH® LPO-586™ (OXIS Research, Portland, USA). Como producto de la reacción, se obtuvo un cromóforo que absorbe a 586 nm. La densidad óptica se midió en un espectrofotómetro SUMA VS-850 (TECNOSUMA, Cuba). La concentración se determinó a partir de la curva de calibración, la cual se construyó utilizando como patrón tetrametoxipropano (TMOP) a diferentes concentraciones (0–5 μM). Las unidades de concentración se expresaron en μmol/L.

2. Determinación de la concentración de los productos avanzados de la oxidación de proteínas.

La determinación en plasma de los productos avanzados de la oxidación de proteínas (PAOP) se realizó mediante la técnica espectrofotométrica descrita por Witko Sarsat en 1998 (8). Este método se basa en el hecho de que los PAOP reaccionan de la misma manera que la cloramina T (patrón) con el yoduro de potasio en medio ácido. Esta reacción rinde un compuesto coloreado que absorbe a 340 nm. La lectura de la absorbancia se realizó en un espectrofotómetro UV-VIS Genesys 8 (SPECTRONIC UNICAM, UK). La concentración se calculó mediante la ecuación obtenida de una curva de calibración, la cual se construyó utilizando distintas concentraciones del patrón (0-100 μM). Los resultados fueron expresados en μmol/L.

Niveles de defensa antioxidante

1. Actividad de la enzima Cu-Zn superóxido dismutasa intraeritrocitaria.

La actividad intraeritrocitaria de la enzima Cu-Zn superóxido dismutasa (SOD1) se determinó mediante la técnica espectrofotométrica descrita por Fulbert y col. en 1992 (9). Éste es un método cinético indirecto, que se basa en la capacidad de esta enzima para inhibir la reacción de reducción del citocromo C. La medición de la variación de la absorbancia a 405 nm se llevó a cabo durante 3 minutos en un espectrofotómetro UV-VIS Genesys 8 (SPECTRONIC UNICAM, UK). Las unidades de actividad enzimática específica se expresaron en U/mg de Hb.

2. Actividad de la enzima catalasa intraeritrocitaria.

La determinación de la actividad enzimática intraeritrocitaria de catalasa (CAT) se realizó utilizando el método referido en el estuche reactivo BIOXYTECH® CAT-520™ (OXIS Research, Portland, USA). La medición de la absorbancia se realizó en un espectrofotómetro UV-VIS Genesys 8 (SPECTRONIC UNICAM, UK). Las unidades de actividad enzimática específica se expresaron en U/mg de Hb.

3. Actividad de la enzima glutatión peroxidasa intraeritrocitaria.

La determinación de la actividad enzimática de la glutatión peroxidasa celular (c-GPx) se realizó como se describe en el estuche reactivo BIOXYTECH® c-GPx-340™ (OXIS Research, Portland, USA). La lectura se realizó durante 3 minutos en un espectrofotómetro UV-VIS Genesys 8 (SPECTRONIC UNICAM, UK). Las unidades de actividad enzimática específica se expresaron en mU/mg de Hb.

4. Actividad enzimática de glutatión reductasa intraeritrocitaria.

La determinación de la actividad enzimática

intraeritrocitaria de la glutatión reductasa (GR) se realizó basándonos en el procedimiento descrito en el estuche reactivo BIOXYTECH® GR-340™ (OXIS Research, Portland, USA). La lectura se realizó durante 3 minutos en un espectrofotómetro UV-VIS Genesys 8 (SPECTRONIC UNICAM, UK). Las unidades de actividad enzimática específica se expresaron en mU/mg de Hb.

Análisis estadístico

En este estudio, se determinaron, como estadísticos descriptivos de tendencia central, la media aritmética para todas las variables en los grupos pacientes y controles. Se compararon las medias aritméticas, de cada una de las variables de respuesta para ambos grupos (casos y controles), mediante la prueba U de Mann-Whitney para muestras independientes. Como criterio de significación estadística, se tomó $p<0.05$. Para el análisis estadístico, nos servimos del programa SPSS versión 16.0 para Windows.

RESULTADOS

Se observó un incremento significativo en las concentraciones plasmáticas de los indicadores de daño oxidativo abordados en el estudio, MDA y los PAOP, en los pacientes con HCC no respondedores, en comparación con el grupo control (**Cuadro 2**).

El comportamiento de las enzimas antioxidantes analizadas se muestra en el **Cuadro 3**. Observamos que las actividades enzimáticas están significativamente incrementadas en los pacientes en comparación con el grupo control.

Cuadro 2
Concentraciones plasmáticas de marcadores de daño oxidativo en los pacientes con HCC no respondedores al tratamiento

	Pacientes (n=27)	Controles (n=24)	P
MDA (μmol/L)	0.98 ± 0.34	0.89 ± 0.70	0.018
PAOP (μmol/L)	37.04 ± 29.07	11.14 ± 12.22	0.0002

*Los resultados se expresan como media ± desviación estándar

Cuadro 3
Actividad de las enzimas antioxidantes en los pacientes con HCC no respondedores al tratamiento

	Pacientes (n=27)	Controles (n=24)	P
SOD1 (U/mg Hb)	17.9 ± 6.0	12.8 ± 6.6	0.018
CAT (U/mg Hb)	232.7 ± 147.3	125.4 ± 36.1	0.0002
c-GPx(mU/mg Hb)	175.7 ± 69.5	29.6 ± 30.3	>0.00001
GR (mU/mg Hb)	6.6 ± 4.3	4.3 ± 2.6	0.014

*Los resultados se expresan como media ± desviación estándar

DISCUSIÓN

En la HVC, el daño celular es determinado predominantemente por los mecanismos de la respuesta inmune. Aunque la fisiopatología que acompaña a la infección es muy compleja, se ha descrito que, en la persistencia de la infección, en la progresión del daño hepático así como en los eventos carcinogénicos está involucrado el EO. Varios estudios han descrito que, durante la infección por el VHC, tiene lugar una producción excesiva de especies reactivas, así como alteraciones en los niveles de enzimas antioxidantes (10-13).

Los lípidos son las biomoléculas más susceptibles al ataque por los radicales libres. Las especies reactivas del oxígeno (ERO) son capaces de iniciar la peroxidación lipídica, al reaccionar con los ácidos grasos poliinsaturados de las membranas biológicas. Las consecuencias dañinas de este mecanismo están relacionadas con la formación de aldehídos citotóxicos, como el MDA, los cuales pueden formar enlaces covalentes con otras biomoléculas afectando su función (14). En este sentido, los resultados concuerdan con los obtenidos previamente por diferentes autores, confirmando que la peroxidación lipídica es un proceso que tiene lugar en pacientes con HCC (10,12,13). De María y col., en 1996, demostraron que las concentraciones de MDA se encontraban elevadas en el hígado y en la sangre de los pacientes con HCC (12). Paradis y col., mediante procedimientos inmunohistoquímicos, confirmaron la presencia de aductos de MDA en muestras de tejido hepático infectado por el VHC (15). Boya y col. hallaron que las células mononucleares de sangre periférica de pacientes con HCC presentaban altas concentraciones de MDA (13). Otros autores, Romero y col. (16) y Levent y col. (17), también detectaron elevadas concentraciones de MDA en el suero de pacientes con HCC, antes de ser tratados con interferón en comparación con individuos sanos.

El daño oxidativo a las proteínas mediado por las ERO puede provocar la oxidación de los residuos de tirosina. Como consecuencia, se forman dímeros de tirosina que dan lugar a la agregación, el entrecruzamiento y la fragmentación de las proteínas. Estos compuestos formados se denominan PAOP (18). No se encontraron referencias en la literatura científica respecto a la concentración de estos productos en pacientes con hepatitis C aguda o crónica; sin embargo, se han detectado altos niveles de estos productos en pacientes con uremia, enfermedades de las arterias coronarias, diabetes y lupus eritematoso sistémico (18-21).

Los resultados respecto a este indicador resultan interesantes, teniendo en cuenta que estos productos, adicionalmente, pueden reflejar la actividad de cloración dependiente de la mieloperoxidasa (MPO), como parte de la respuesta inflamatoria; se confirma, mediante este marcador, el papel de los procesos inflamatorios en la patogénesis de la infección mediada por el VHC, descrito por otros autores (22,23).

Los resultados obtenidos en relación con el incremento en la actividad enzimática de la SOD1 en esta infección, cuya patogénesis involucra al EO, pudiera constituir un fenómeno compensatorio ante la generación excesiva de aniones superóxido, sustrato de esta enzima, mediado por la activación de la NADPH oxidasa (NOX) en respuesta a la infección por el VHC. En concordancia con estos hallazgos, varios autores reportan incrementos significativos en la actividad de esta enzima en pacientes con HCC (13,24-26); sin embargo, no se describe el comportamiento de este marcador en pacientes que no respondieron a la terapia combinada estándar. Otros resultados en la literatura, en relación con este marcador en pacientes con HCC, resultan contradictorios. Algunos autores han reportado reducciones significativas en los niveles de SOD1 respecto a sujetos sanos (17,27), mientras que otros no demostraron diferencia alguna (28). La razón de estas contradicciones puede deberse a varios factores, entre ellos, la heterogeneidad de los grupos estudiados y la obtención de las muestras

en diferentes momentos durante el transcurso de la enfermedad.

Los resultados obtenidos muestran, además, un aumento concomitante en las actividades de las enzimas CAT y c-GPx, en el grupo de estudio. Este aumento redundante de las enzimas que descomponen el peróxido de hidrógeno, probablemente, refleja una respuesta adaptativa de la célula ante una elevada generación de esta especie oxidante por la acción de la SOD1. En relación con el comportamiento de estas enzimas, otros autores han reportado el incremento de la actividad de la CAT, en pacientes con HCC (29). Contradictoriamente, Castellano-Higuera y col. no encontraron diferencias entre los pacientes con HCC que no consumían alcohol y los individuos sanos (28). No se encontraron reportes de este marcador en pacientes con HCC que no responden al tratamiento convencional.

Por otra parte, el incremento en la actividad de la c-GPx también pudiera relacionarse con el incremento del proceso de peroxidación lipídica, observado en estos pacientes. Debido a que, entre otras funciones, esta enzima participa en la descomposición de los peróxidos lipídicos en moléculas menos tóxicas, protegiendo a las células de las consecuencias de este proceso oxidativo (30). Además, se ha propuesto que esta enzima participa directamente en los mecanismos de citotoxicidad mediados por los linfocitos T, permitiendo que los neutrófilos y los macrófagos completen la lisis de las células infectadas por el VHC que han sido fagocitadas (25).

En relación con la actividad de la GR, a pesar de que existen pocos reportes acerca del comportamiento de esta enzima en las hepatitis virales, nuestros resultados son similares a los obtenidos por Ko y col., quienes midieron este marcador en pacientes con HCC no tratados (25).

El incremento en la actividad de la GR se correlaciona con lo observado en relación a la enzima c-GPx, debido a que la GR permite la regeneración del glutatión reducido (GSH), el cual es utilizado como cofactor para la actividad peroxidativa de la c-GPx, como parte del ciclo redox del glutatión. Adicionalmente, esta respuesta podría compensar la deficiencia de GSH que se produce, debido a que, como consecuencia del daño hepático provocado por la infección, se ve afectada la síntesis de este antioxidante.

De manera general, consideramos que el incremento observado en la actividad de las enzimas estudiadas puede estar relacionado con varios factores: el aumento en las concentraciones de sus sustratos, la sobreexpresión de los genes que codifican para ellas, o ambos eventos. En este sentido, se ha planteado que, en los estadios crónicos de diversas patologías, el aumento en la generación de las ERO, a pesar de no causar daños irreversibles, sí modifican el estado redox, alcanzando las células lo que se ha denominado como “estado quasi-estable”. En estas condiciones, se afecta la regulación de las vías de señalización redox, lo que da lugar a una sobrerregulación de los patrones de expresión génicos controlados por estas vías (3,31). Una vez analizado el comportamiento de las enzimas antioxidantes en los pacientes con HCC no respondedores, sugerimos que estos eventos podrían ser la causa del incremento en la actividad de las enzimas antioxidantes estudiadas.

Finalmente, podemos decir que este trabajo constituye un primer acercamiento acerca del comportamiento de algunos indicadores de EO en una muestra de pacientes con HCC no respondedores a la terapia convencional. Además, se encontró que, en los pacientes que no responden eficazmente a la terapia combinada estándar, los lípidos y las proteínas muestran un incremento en las modificaciones oxidativas. Por otra parte, el aumento observado en la actividad de las enzimas antioxidantes, en este grupo de pacientes, se puede interpretar como un efecto adaptativo a condiciones de alta generación de especies pro-oxidantes mediado por la presencia del virus y por las condiciones inflamatorias asociadas con esta infección.

En su conjunto, estos hallazgos apoyan la correlación existente entre el EO y la patogénesis de la HCC. Los marcadores utilizados podrían ser empleados para evaluar la respuesta de pacientes con HCC no respondedores a otros esquemas terapéuticos. Se necesitarán otros estudios para confirmar esta hipótesis.

REFERENCIAS

1. **Harman D.** Free radical theory of aging: an update: increasing the functional life span. Ann N Y Acad Sci 2006; 1067:10-21.
2. **Mc Cord JM, Fridovich I.** Superoxide dismutase: an enzymic function for erythrocuprein (hemocuprein). J Biol Chem 1969; 244:6049-55**.**
3. **Novo E, Parola M.** Redox mechanisms in hepatic chronic wound healing and fibrogenesis. Fibrogenesis Tissue Repair 2008; 1:5.
4. **Matés JM, Pérez-Gómez C, Nuñez de Castro I.** Antioxidant Enzymes and Human Diseases. Clin Biochem 1999; 32:595-603.
5. National Institute of Health consensus statement on management of hepatitis C: 2002. NIH Consens State Sci Statements 2002; 19:1-46.
6. **Arús E.** Historia natural de la infección por el virus de la Hepatitis C. En: Hernádez JC, Samada M, editores. Hepatología 2006. Ciudad de la Habana: Editorial CIMEQ; 2006. p15.
7. **Stauber RE, Stadlbauer V.** Novel approaches for therapy of chronic hepatitis C. J Clin Virol 2006; 36:87-94.
8. **Witko-Sarsat V, Friedlander M, Nguyen Khoa T, Capeillère-Blandin C, Nguyen AT, Canteloup S,** *et al.* Advanced Oxidation Protein Products as Novel Mediators of Inflammation and Monocyte Activation in Chronic Renal Failure. J Immunol 1998; 161:2524-32.
9. **Fulbert JC, Succari M, Cals MJ.** Semi-automated Assay of Erythrocite Cu-Zn Superoxide Dismutase Activity. Clin Biochem 1992; 25:115-9.
10. **Groenbaek K, Friis H, Hansen M, Ring-Larsena H, Krarup HB.** The effect of antioxidant supplementation on hepatitis C viral load, transaminases and oxidative status: a randomized trial among chronic hepatitis C virus-infected patients. Eur J Gastroenterol Hepatol 2006; 18:985–9.
11. **Mahmood S, Kawanaka M, Kamei A, Izumi A, Nakata K, Niiyama G,** *et al.* **Immunohistochemical evaluation of oxidative stre**ss markers in chronic hepatitis C. Antioxid Redox Signal 2004; 6:19-24.
12. **De María N, Colantoni A, Fagiuoli S, Liu GJ, Rogers BK, Farinati F,** *et al.* Association between reactive oxygen species activity in chronic hepatitis C and disease. Free Radic Biol Med. 1996; 21:291-5.
13. **Boya P, Pena A, Beloqui O, Larrea E, Conchillo M, Castelruiz Y,** *et al.* Antioxidant status and glutathione metabolism in peripheral blood mononuclear cells from patients with chronic hepatitis. J Clin Hepatol 1999; 31:808-14.
14. **Sögergren E. Lipid Peroxidation in vivo.** Evaluation and Application of Methods for Measurements [dissertation]. Uppsala: Uppsala Univ.; 2000.
15. **Paradis V, Mathurin P, Kollinger M, Imbert-Bismut F, Charlotte F, Piton A, et al.** In situ detection of lipid peroxidation in chronic hepatitis C: correlation with pathological features. J Clin Pathol 1997; 50:401-6.
16. **Romero FJ, Bosch-Morell F, Romero MJ, Jareño EJ, Romero B, Marín N,** *et al.* Lipid Peroxidation Products and Antioxidants in Human Disease. Environ Health Perspect 1998; 106:1229-34.
17. **Levent G, Ali A, Ahmet A, Polat EC, Aytaç C, Ayşe E, Ahmet S.** Oxidative stress and antioxidant defense in patients with chronic hepatitis C patients before and after pegylated interferon alfa-2b plus ribavirin therapy. J Transl Med 2006; 4:25.
18. **Witko-Sarsat V, Friedlander M, Capeillère-Blandin C, Nguyen-Khoa T, Nguyen AT, Zingraff J, et al.** Advanced oxidation protein products as a novel marker of oxidative stress in uremia. Kidney Int 1996; 49:1304-13.
19. **Shacter, E.** Quantification and significance of protein oxidation in biological samples. Drug Metab Rev 2000; 32:307-26.
20. **Lazárová M, Stejskal, Laèòák B, Václavík J, Adamovská S, Ochmanová R,** *et al.* The entioxidant acetylcysteine reduces oxidatives stress by decreasing level of AOPPs. Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub 2004; 148:131-3
21. **Selmeci L, Seres L, Antal M, Lukács J, Regöly-Mérey A, Acsády G.** Advanced oxidation protein products (AOPP) for monitoring oxidative stress in critically ill patients: a simple, fast and inexpensive automated technique. Clin Chem Lab Med 2005; 43:294–7.
22. **Chang ML, Yeh CT, Lin DY, Ho YP, Hsu CM, Bissell DM.** Hepatic inflammation mediated by hepatitis C virus core protein is ameliorated by blocking complement activation. BMC Med Genomics 2009; 2:51.
23. **Zeremski M, Petrovic LM, Chiriboga L, Brown QB, Yee HT, Kinkhabwala M,** *et al.* Intrahepatic levels of CXCR3-associated chemokines correlate with liver inflammation and fibrosis in chronic hepatitis C. Hepatology 2008; 48:1440-50.
24. **Melhem A, Stern M, Shibolet O, Israeli E, Ackerman Z, Pappo O,** *et al.* Treatment of chronic hepatitis C virus infection via antioxidants. Results of a phase I clinical trial. J Clin Gastroenterol 2005; 39:737-42.

25. **Ko WS, Guo CH, Yeh MS, Lin LY, Hsu GS, Chen PC,** *et al.* Blood micronutrient, oxidative stress, and viral load in patients with chronic hepatitis C. World J Gastroenterol 2005; 11:4697-702.
26. **Sezer S, Tutal E, Aldemir D, Türkoglu S, Demirel OU, Afsar B,** *et al.* Hepatitis C infection in hemodialysis patients: Protective against oxidative stress?. Transplant Proc 2006; 38:406-10.
27. **Irshad M, Chaudhuri PS, Joshi YK.** Superoxide dismutase and total antioxidant levels in various forms of liver diseases. Hepatol Res 2002; 23:178-84.
28. **Castellano-Higuera A, González-Reimers E, Alemán-Valls MR, Abreu-González P, Santolaria-Fernández F, Vega-Prieto de la M,** *et al.* Cytokines and lipid peroxidation in alcoholics with chronic hepatitis C virus infection. Alcohol Alcohol 2008; 43:137-42.
29. **Karabulut AB, Sonmez E, Bayindir Y, Gözükara E.** A Comparison of erythrocyte superoxide dismutase and catalase activity in patients with hepatitis C infection. Turk J Med Sci 2002; 32:313-16.
30. **Chaudière J, Ferrari-Iliou R.** Intracellular antioxidants: from chemical to biochemical mechanisms. Food Chem Toxicol 1999; 37:949-62.
31. **Dröge W.** Free Radicals in the Physiological Control of Cell Function. Physiol Rev 2002; 82:47–95.