

1 INTRODUÇÃO

A infecção crônica pelo vírus da hepatite C (*Hepatitis C Virus* ou HCV) constitui um dos maiores problemas de saúde pública no mundo. A prevalência da infecção pelo HCV vem sendo estimada com base na análise de resultados da frequência do marcador sérico anti-HCV, principalmente em indivíduos pré-doadores de sangue. Em 1997, segundo estimativa da Organização Mundial de Saúde (OMS), 3% da população mundial foram infectados pelo HCV, representando mais de 170 milhões de indivíduos com risco de desenvolvimento de cirrose hepática e câncer de fígado (carcinoma hepatocelular). A prevalência da infecção variou entre valores inferiores a 0,1% em países como Suécia, Finlândia, Noruega e Reino Unido, até 18,1% no Egito. Neste último, foram registradas as maiores taxas de soroprevalência, em grande parte devida à administração de medicamentos injetáveis realizada em campanhas de tratamento da esquistossomose realizadas no período 1961-1986 (Frank et al., 2000). A estimativa mais recente da OMS revelou uma taxa global de soroprevalência de anticorpos anti-HCV de aproximadamente 2%, representando uma redução para 123 milhões de indivíduos infectados em todo o mundo na última década. Além disso, levando-se em consideração uma estimativa de 70 – 85% como a proporção de indivíduos que evoluem com infecção crônica, a OMS estimou em 86 a 104 milhões o número de indivíduos que podem estar com infecção crônica pelo HCV (Perz et al., 2004).

O Ministério da Saúde (MS) do Brasil criou, em 5 de fevereiro de 2002, o Programa Nacional para a Prevenção e o Controle das Hepatites Virais (PNHV), visando ao aprimoramento de um conjunto de ações de saúde relacionadas às hepatites virais, com ações de prevenção e assistência aos pacientes com hepatites virais. No entanto, a real prevalência da infecção pelo HCV permanece ainda imprecisa em nosso País. A OMS (1997) estimou que 2,60% da população brasileira já foram expostos ao HCV. Através de inquérito de caráter nacional sobre o perfil epidemiológico da infecção pelo HCV no Brasil, foi elaborado um relatório pelo Grupo de Estudo da Sociedade Brasileira de Hepatologia, no qual a frequência do

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

marcador anti-HCV em pré-doadores de sangue foi estimada em 1,23%, representando mais de 2,1 milhões de indivíduos (Fonseca, 1999). Com base em dados da rede de hemocentros de pré-doadores de sangue, a frequência do marcador anti-HCV variou entre as macro-regiões brasileiras: 0,28% no Centro-Oeste, 0,43% no Sudeste, 0,46% no Sul, 0,55% no Nordeste e 0,62% no Norte (MS, 2002). Para estimar a frequência das hepatites virais (A, B e C) nas diversas macro-regiões brasileiras e identificar fatores de risco associados a essas infecções, o MS em convênio com a Universidade de Pernambuco e Organização Panamericana de Saúde vem realizando, desde 2004, inquérito soropidemiológico, de base populacional, nas capitais do País. A fase de pesquisa de campo já foi concluída em algumas macro-regiões, e resultados preliminares mostraram taxa de prevalência de anti-HCV variando entre 0,94 e 1,89% na faixa etária compreendida entre 10 e 69 anos (MS, 2008). Andrade et al. (2006) estimaram em 0,90% a prevalência da infecção pelo HCV com base na detecção de anticorpos anti-HCV em pré-doadores de sangue no Estado do Rio de Janeiro (Brasil).

Em termos de saúde pública, a grande importância da infecção pelo HCV não se restringe apenas ao enorme número de indivíduos acometidos. Tanto a infecção aguda como a crônica pelo HCV são geralmente assintomáticas, conferindo caráter silencioso à infecção. Esse fato, aliado à alta taxa de cronicidade da infecção, contribuem a longo prazo para o desenvolvimento de complicações graves como cirrose hepática e carcinoma hepatocelular (Ascione et al., 2007). Embora seja um vírus essencialmente hepatotrópico, a presença do RNA viral já foi demonstrada em sítios extra-hepáticos, como diferentes subpopulações de células do sangue periférico: linfócitos B, linfócitos T, monócitos, células dendríticas e plaquetas (Lerat et al., 1998; Ramos-Casals e Font, 2005). A interação do HCV com plaquetas do sangue periférico, bem como a destruição imunológica das mesmas parecem constituir dois dos principais mecanismos envolvidos na patogênese da trombocitopenia (redução da contagem de plaquetas do sangue periférico) associada ao HCV (Hamaia et al., 2001; Kajihara et al., 2003). Essa alteração hematológica se destaca dentre as diversas manifestações extra-hepáticas da infecção pelo HCV devido suas implicações terapêuticas (Dieterich e Spivak, 2003; Afdhal et al., 2008).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Histórico

O reconhecimento da transfusão sangüínea como procedimento de risco para as hepatites virais adveio de estudos que descreveram séries de casos novos de hepatites pós-transfusionais (HPT), incluindo alguns casos fatais, dentre os indivíduos que haviam recebido transfusão sangüínea nos últimos seis meses. Além disso, maiores taxas de incidência de HPT foram registradas dentre os indivíduos que receberam múltiplas transfusões (Kunin, 1959; Allen e Sayman, 1962; Grady e Chalmers, 1964; Hampers et al., 1964).

Na década de 60, o Instituto Nacional da Saúde (*National Institutes of Health* ou NIH), dos Estados Unidos da América (EUA), iniciou uma série de três estudos prospectivos sobre HPT em pacientes submetidos à cirurgia cardíaca. O primeiro estudo (jan 1965 a out 1968) teve como objetivo determinar a incidência das HPT e sua associação com a procedência das unidades de sangue transfundidas. Esse estudo demonstrou freqüência total de 38% de casos de HPT, porém 42 (51%) dos 82 pacientes que receberam transfusão de sangue proveniente de doadores remunerados apresentaram HPT, sendo a maioria dos casos pertencentes à forma anictérica (29/42), ao passo que nenhum caso de HPT foi registrado no grupo constituído por 28 pacientes que receberam transfusão de sangue proveniente de doadores voluntários (Walsh et al., 1970). O segundo estudo (set 1968 a fev 1970) teve como objetivo investigar a incidência de HPT em 92 pacientes, estratificados de acordo com a positividade ou não para o antígeno de superfície do vírus da hepatite B (*Hepatitis B Surface Antigen* ou HBsAg) nas unidades de sangue transfundidas, e demonstrou freqüência total de 33% de casos de HPT. Esse estudo também revelou que 11 (69%) dos 16 pacientes que receberam pelo menos uma unidade de sangue com positividade para o HBsAg apresentaram HPT, uma proporção

significativamente superior àquela observada no grupo dos 76 pacientes que receberam transfusão de sangue proveniente de doadores com sorologia negativa para o HBsAg, no qual 19 (25%) apresentaram HPT. Além disso, 73% dos casos de HPT registrados no grupo com positividade para o HBsAg apresentavam icterícia, em contraste aos 26% de casos icterícios registrados no grupo com sorologia negativa para o HBsAg (Holland et al., 1973). O terceiro estudo (fev 1970 a mar 1971) demonstrou que 9 (7%) dos 126 pacientes estudados apresentaram HPT, dos quais três foram da forma icterícia, após instituição de medidas preventivas como a exclusão de doadores de sangue remunerados e doadores com positividade para o HBsAg, o que representou uma drástica redução (79%) do número de casos novos de HPT em relação ao estudo anterior (Alter et al., 1972).

Apesar da exclusão desses dois principais fatores de risco para as hepatites virais, casos residuais de HPT não relacionados aos vírus da hepatite A (*Hepatitis A Virus* ou HAV) e da hepatite B (*Hepatitis B Virus* ou HBV) continuaram a ser notificados. Contudo, as evidências disponíveis não suportavam ainda a hipótese de outra forma de hepatite viral, “hepatite tipo C” (Purcell, 1974, p.532). Prince et al. (1974) relataram a ocorrência de 51 casos de HPT em 204 pacientes submetidos à cirurgia cardiovascular no Hospital da Universidade de Nova Iorque, EUA, dos quais 36 casos (71%) não apresentavam evidências epidemiológica e clínica para hepatite A, bem como sorológica para hepatite por HBV e citomegalovírus (CMV) e postularam a existência de um (ou mais) vírus da hepatite tipo C como provável agente causal dessas formas de HPT. Feinstone et al. (1975) publicaram uma série de 22 casos de HPT não relacionados a esses agentes, bem como a outros agentes hepatotrópicos conhecidos, como o vírus Epstein-Barr (*Epstein-Barr Virus* ou EBV), e sugeriram a participação de um (ou mais) agente viral, ainda não identificado, na etiologia das HPT. Knodell et al. (1975) registraram a ocorrência de 34 casos (21%) de HPT em 162 pacientes submetidos à cirurgia cardíaca em dois hospitais do Exército dos EUA, dos quais 30 casos (88%) não foram relacionados aos agentes hepatotrópicos conhecidos. O termo “hepatite não-A, não-B” (HNANB) foi introduzido para descrever essa forma de hepatite (Alter et al., 1975a; Alter et al., 1975b).

A ausência de marcador sorológico associado à infecção pelo(s) agente(s) das HNANB, bem como de um modelo animal apropriado para a infecção

experimental, dificultou a investigação etiológica das HNANB. A partir do final da década de 70, diferentes grupos de pesquisadores demonstraram ser possível a transmissão experimental do(s) agente(s) das HNANB aos chimpanzés pela administração parenteral de diferentes materiais infecciosos de origem humana (soro, plasma, fatores anti-hemofílicos – fator VIII, fator IX), tanto de indivíduos hemotransfundidos que desenvolveram HPT, como de doadores implicados nos casos de HPT (Hollinger et al., 1978; Alter et al., 1978; Tabor et al., 1978; Wyke et al., 1979; Bradley et al., 1979; Bradley et al., 1981; Yoshizawa et al., 1982; Hollinger et al., 1984; Bradley et al., 1985a; Prince et al., 1985). O acúmulo de evidências epidemiológicas, clínicas, histopatológicas e ultra-estruturais, obtidas a partir de estudos envolvendo chimpanzés e pacientes com HNANB, sustentou a hipótese inicial de haver mais de um agente causal para as HNANB (Prince et al., 1974; Alter et al., 1978; Hollinger et al., 1978; Tabor et al., 1978; Wyke et al., 1979; Bradley et al., 1979; Shimizu et al., 1979; Bradley et al., 1980; Hollinger et al., 1980; Dienstag, 1983a; Dienstag, 1983b; Bradley, 1985b).

Com o sucesso da infecção experimental de chimpanzés, estudos posteriores forneceram dados físico-químicos e ultraestruturais que tornaram evidente a natureza viral do(s) agente(s) etiológico(s) das HNANB (Bradley et al., 1979; Bradley et al., 1980; Bradley et al., 1981; Yoshizawa et al., 1982; Feinstone et al., 1983; Hollinger et al., 1984; Bradley et al., 1985a; Bradley, 1985b; Prince et al., 1985; He et al., 1987).

A partir de 1986, foi observado mais um declínio na incidência das HNANB em decorrência da adoção, na triagem sorológica dos doadores de sangue, da dosagem da alaninoaminotransferase (*Alanine aminotransferase* ou ALT) e da detecção de anticorpos contra o antígeno *core* do vírus da hepatite B, como marcadores associados ao risco aumentado de transmissão dessa forma de hepatite (*Antibody to Hepatitis B Core Antigen* ou anti-HBc) (Koziol et al., 1986).

Por mais de uma década, as tentativas de caracterização do(s) agente(s) etiológico(s) das HNANB foram dificultadas, dentre outros fatores, devido sua presença em baixas concentrações no plasma e em amostras de fígado humano e de chimpanzés, bem como pela falta de um sistema eficiente de replicação *in vitro* (Shih et al., 1986).

Choo et al. (1989), utilizando-se de diferentes técnicas de biologia molecular, relataram a clonagem e o seqüenciamento genético parcial de amostra viral isolada do plasma de chimpanzés infectados cronicamente pelo(s) agente(s) das HNANB. Dessa forma, o agente causal das HNANB passou a ser denominado vírus da hepatite C (*Hepatitis C Virus* ou HCV). Os pesquisadores também demonstraram que o genoma viral era constituído de uma molécula de RNA de polaridade positiva, com aproximadamente 10.000 nucleotídios. Estudos anteriores já haviam indicado que esse agente viral apresentava envelope devido sua sensibilidade aos solventes orgânicos, e diâmetro inferior a 80 nm (Bradley et al., 1985a; He et al., 1987). A partir da identificação do genoma viral e do desenvolvimento de testes sorológicos utilizando antígeno recombinante (c100-3), estudos de soroprevalência demonstraram que a grande maioria dos casos clínicos de HPT-NANB e HNANB esporádica (adquirida em comunidade) tinha como agente etiológico o HCV (Alter et al., 1989; Choo et al., 1990; Alter et al., 1992). A detecção de anticorpos anti-c100-3, produzidos mais tardiamente no curso da infecção pelo HCV, foi associada à taxa de soroprevalência de anticorpos anti-HCV mais baixa nos pacientes em fase aguda de HPT-NANB (Kuo et al., 1989). Com a implementação de ensaios imunoenzimáticos de segunda geração foi possível incrementar a taxa de detecção de anticorpos anti-HCV em doadores de sangue e pacientes com HPT (Aach et al., 1991).

2.2 Estrutura e organização genômica do HCV

O HCV é um vírus envelopado cujo genoma é formado por um filamento simples de RNA, linear, de polaridade positiva, contendo aproximadamente 9.600 nucleotídios. O envelope viral é formado por uma camada bimolecular de natureza lipídica derivado da membrana plasmática da célula hospedeira, na qual são ancoradas as duas glicoproteínas do envelope codificadas pelo genoma viral, E1 e E2. Internamente ao envelope, encontra-se o nucleocapsídeo formado por várias cópias da proteína core que envolve o RNA viral (Penin et al., 2004) (Figura 2.1).

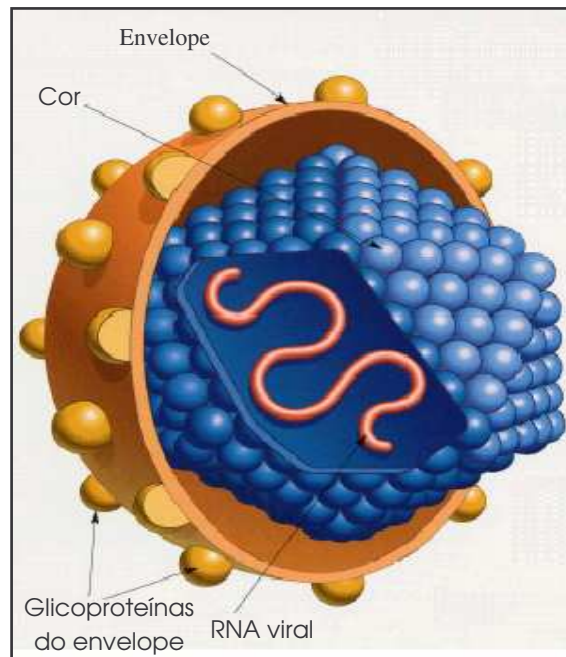


Figura 2.1. Representação esquemática da estrutura da partícula do vírus da hepatite C. Disponível em: URL:http://www.trugene.com/Labs/HCV/Page_1_HCV_Tech_Bulletin.pdf. (Acesso em: 25 mar. 2003). (Figura adaptada para o português).

O genoma do HCV apresenta uma única e longa fase de leitura aberta (*Open reading frame* ou ORF) que abrange quase que todo o genoma viral e codifica uma poliproteína precursora de cerca de 3.000 aminoácidos. Na extremidade 5' dessa fase de leitura, está localizado o códon de iniciação AUG para metionina e, na extremidade 3', encontra-se o códon de finalização UGA. Mais de 10 proteínas diferentes são formadas como resultado do processamento proteolítico co- e pós-traducional da poliproteína precursora, processamento esse dependente de proteases codificadas pelo genoma viral (proteínases NS3 e NS2-NS3) e da célula hospedeira (signalase ou peptidase sinal). As proteínas estruturais – proteínas do nucleocapsídeo ou core (C), glicoproteínas do envelope 1 (E1) e envelope 2 (E2) e P7 estão localizadas na extremidade aminoterminal (N-terminal), e as proteínas não-estruturais (NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A e NS5B) estão localizadas na

extremidade carboxiterminal (C-terminal) da poliproteína (Figura 2.2) (Choo et al., 1991; Houghton et al., 1991; Grakoui et al., 1993).



Figura 2.2. Representação esquemática da organização das proteínas derivadas da poliproteína precursora codificada pelo genoma do vírus da hepatite C.

Durante o processo de tradução da poliproteína precursora do HCV, a cadeia polipeptídica em extensão é dirigida para o interior do retículo endoplasmático rugoso (RER) através do seu domínio E1. Na extremidade C-terminal da proteína core, há uma pequena região (de aproximadamente 20 aminoácidos) que funciona como uma seqüência sinal (peptídeo sinal) necessária à destinação da glicoproteína E1 ao interior do RER. A clivagem dessa seqüência pela peptidase sinal presente no interior do RER permite a liberação da proteína core a partir da cadeia polipeptídica em formação. A proteína core imatura (com a seqüência sinal de E1) é composta de 191 aminoácidos e seu peso molecular é de aproximadamente 21 kDa. Posteriormente, a seqüência sinal de E1 é removida por outra peptidase (*Signal peptide peptidase* ou SPP) com atividade proteolítica ao nível da camada bimolecular de lipídios da membrana do RER, terminando a proteína madura próxima do aminoácido da posição 179. A proteína core é rica em resíduos de arginina e lisina, o que lhe confere um caráter mais básico. Essa característica, aliada à presença de outra seqüência sinal (representada pelos aminoácidos das posições 1–75), propicia sua interação com o RNA viral. Além disso, na sua extremidade N-terminal também foram descritos alguns domínios com potencial de sinalização para uma localização intranuclear e para ligação ao DNA da célula. A proteína core está entre as proteínas mais conservadas do HCV (van Doorn, 1994; Forns e Bukh, 1999; Major et al., 2001; Roingeard e Hourieux, 2008).

Embora uma pequena quantidade da proteína core seja encontrada no núcleo, a maior quantidade dessa proteína está presente no citoplasma, associada às membranas do RER ou às gotículas lipídicas. A principal função da proteína core

é estrutural e está ligada à formação do nucleocapsídeo viral. Contudo, devido a sua capacidade de se associar com diferentes componentes celulares foram atribuídas a essa proteína diversas outras funções, tais como: modulação da transcrição gênica, na sinalização, proliferação e morte celular, bem como sua interferência no metabolismo lipídico, na oncogênese do carcinoma hepatocelular e na supressão da resposta imune do hospedeiro (Penin et al., 2004).

Recentemente, foi descrita a descoberta de nova proteína, chamada proteína F, de 17 kDa, de função ainda desconhecida e sintetizada a partir do desvio da fase de leitura (processamento por *frame-shift*) das seqüências da proteína core da poliproteína precursora (Xu et al., 2001). Esse desvio constitui a fase de leitura alternativa (*Alternate reading frame* ou ARF), sendo responsável pela geração de proteínas quiméricas contendo segmentos da proteína core ligados covalentemente a outros codificados pela ARF. As proteínas da ARF são produzidas durante a infecção pelo HCV e são capazes de estimular respostas imunes específicas. Embora o papel das proteínas da ARF na replicação viral não seja ainda conhecido, especula-se que tais proteínas possam ser responsáveis por alguns dos efeitos atribuídos à proteína core, como a indução do câncer de fígado e alterações da resposta imune do hospedeiro (Branch et al., 2005).

As proteínas do envelope E1 e E2 são proteínas transmembranas, com domínios de 160 a 334 aminoácidos, respectivamente, localizados na extremidade N-terminal voltados para a luz do RER, e um curto domínio transmembrana de aproximadamente 30 aminoácidos na extremidade C-terminal. As proteínas do envelope E1 e E2 formam heterodímeros ancorados à superfície da membrana através do segmento transmembrana que contém uma seqüência sinal. Ambas as proteínas são sintetizadas a partir da clivagem enzimática promovida pela peptidase sinal do RER e sofrem glicosilação ainda nas cisternas do RER. As glicoproteínas do envelope E1 e E2 possuem pesos moleculares de aproximadamente 35 kDa e 70 kDa, respectivamente. As glicoproteínas E1 e E2 exibem alto grau de variabilidade genética em suas seqüências quando comparadas entre diferentes genótipos do HCV, e mesmo entre subtipos do mesmo genótipo. Na extremidade N-terminal da proteína E2, há uma região composta de 27 aminoácidos, das posições 1–27 da glicoproteína E2 (correspondendo às posições 384–410 da poliproteína), que é

caracterizada por extrema variabilidade na seqüência de aminoácidos e denominada região hipervariável 1 (*Hypervariable region 1* ou HVR1). A região HVR1 contém um importante epítipo para anticorpos neutralizantes produzidos durante a infecção pelo HCV. A glicoproteína E2 de isolados do subtipo 1b do HCV apresenta outra região hipervariável, denominada HVR2, composta dos sete aminoácidos das posições 91–97 da glicoproteína E2 (correspondendo às posições 461–480 da poliproteína) (Kato, 2001). Recentemente, foi descrita uma terceira região hipervariável, chamada HVR3, abrangendo os aminoácidos das posições 431–466 da glicoproteína E2 (Troesch et al., 2006).

As glicoproteínas do envelope possuem papel essencial no processo de ligação do HCV ao receptor da célula e posterior indução da fusão entre o envelope viral e a membrana plasmática da célula hospedeira. O sítio de ligação ao receptor CD81 está localizado em uma região do ectodomínio da glicoproteína E2 compreendendo seqüências descontínuas entre os aminoácidos das posições 384 a 661. Owsianka et al. (2006) identificaram resíduos de aminoácidos conservados (W420, Y527, W529, G530 e D535) na glicoproteína E2 de todos os genótipos do HCV com papel crítico na ligação do HCV à molécula CD81. Drummer et al. (2006) estudaram o papel de resíduos de aminoácidos localizados em uma região conservada e contínua (G⁴³⁶WLAGLFY) localizada entre as HVR1 e HVR2 da glicoproteína E2 e demonstraram ter essa região papel funcional na ligação de E2 à molécula CD81 e nos estágios subseqüentes do ciclo replicativo do HCV como a fusão do envelope viral às membranas celulares.

Além disso, a glicoproteína E2 é capaz de interagir com a proteína quinase R (*Protein kinase R* ou PKR), cuja expressão é induzida pelo interferon (IFN), tornando-se ativa em presença de RNA fita dupla. A proteína PKR associa-se ao fator eucariótico 2 de iniciação da tradução (*Eukaryotic translation initiation factor 2* ou eIF2) durante a síntese protéica. A proteína E2 possui importante domínio formado por 12 aminoácidos com homologia para sítios de fosforilação na proteína PKR e do eIF2 (*PKR/eIF2alpha phosphorylation homology domain region* ou E2-PePHD), sendo capaz de bloquear a atividade inibitória da PKR sobre a replicação viral. Assim, a interação E2-PKR parece constituir um dos mecanismos de resistência viral ao interferon (Drazan, 2000).

A proteína p7 é uma proteína composta de 63 aminoácidos, com dois domínios transmembrana (N-terminal e C-terminal). Na extremidade C-terminal do segmento transmembrana, existe um peptídeo que funciona como seqüência sinal, resultando da clivagem enzimática do precursor E2-p7 pela peptidase sinal do RER. A proteína p7 é uma proteína integral da membrana, sendo capaz de formar hexâmeros envolvidos na formação de canais para passagem de íons. Uma função moduladora sobre a permeabilidade da membrana foi atribuída à proteína p7, sendo considerada uma virosporina com papel importante na maturação e liberação da partícula viral (Penin et al., 2004; Brass et al., 2006). A Figura 2.3 ilustra o processamento das proteínas estruturais a partir da poliproteína precursora codificada pelo genoma do HCV.

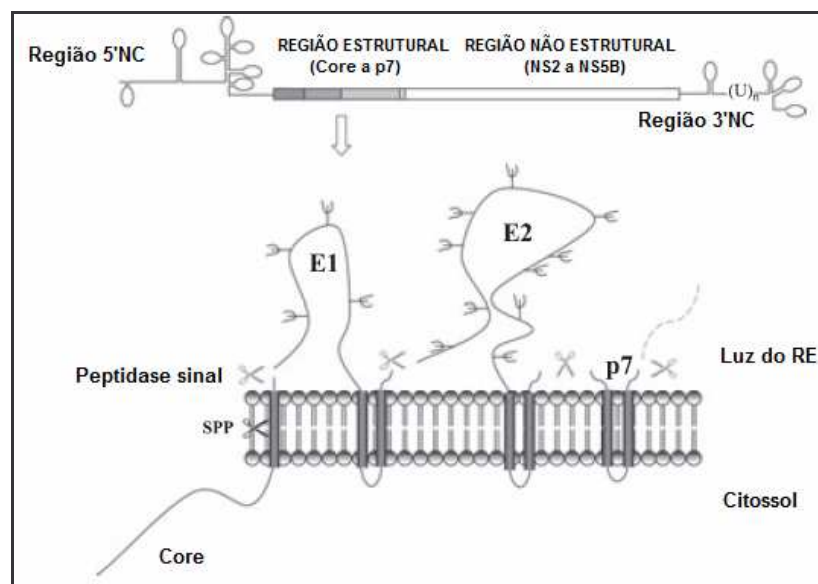


Figura 2.3. Representação esquemática do processamento das proteínas estruturais a partir da poliproteína precursora. Locais de clivagem pelas peptidases de sinal localizadas na luz do retículo endoplasmático (RE) são indicados por figuras de pequenas tesouras: core/E1, E1/E2, E2/p7, p7/NS2. Local de clivagem por outra peptidase (*Signal peptide peptidase* ou SPP) é indicado pela figura de pequena tesoura ao nível da bicamada lipídica da membrana do RE. Fonte: Roingeard P e Hourieux C. (2008, p.158). (Figura adaptada para o português).

As proteínas não-estruturais apresentam grau variável de heterogeneidade, sendo mais conservadas as proteínas NS3 e NS5B (Bukh et al., 1997). A proteína

NS2 é uma proteína transmembrana, de aproximadamente 23 kDa, com a extremidade C-terminal voltada para o interior do RER e a extremidade N-terminal para o citossol. A sua única função biológica conhecida é a participação na composição do complexo proteolítico NS2-NS3, responsável pela clivagem autocatalítica da junção NS2-NS3 da poliproteína precursora (Forns e Bukh, 1999; Drazan, 2000). Essa protease dependente de zinco compreende toda a extensão de NS2 e um domínio localizado na extremidade N-terminal de NS3 (Penin et al., 2004; Suzuki et., 2007).

A proteína NS3, de aproximadamente 70 kDa, é constituída de 631 aminoácidos. Trata-se de uma proteína multifuncional, uma vez que possui um domínio constituído de 189 aminoácidos em sua extremidade N-terminal com atividade de serino-protease, e outro domínio de 442 aminoácidos em sua extremidade C-terminal com atividades de RNA-helicase e nucleotídeo-trifosfatase (NTPase). A proteína NS4A, de aproximadamente 8 kDa, é composta de 54 aminoácidos e forma com NS3 um complexo heterodimérico estável, agindo como um cofator necessário à atividade proteolítica de NS3. Nessa forma, a protease NS3 é ativada, sendo capaz de promover tanto a clivagem no sítio de junção NS3-NS4A (ação cis) como a clivagem nos sítios de junção de NS4A/NS4B, NS4B/NS5A e NS5A/NS5B (ação trans), resultando na síntese das proteínas NS3, NS4A, NS4B, NS5A e NS5B.

A proteína NS4B é uma proteína intrínseca da membrana, de aproximadamente 27 kDa, composta de 261 aminoácidos, com as extremidades N-terminal e C-terminal orientadas para o citossol. Embora pouco conhecida, a função biológica da NS4B parece estar relacionada à indução de modificações nas membranas derivadas do retículo endoplasmático (RE), denominadas rede membranosa, que servem de estrutura para a formação do complexo de replicação do HCV (Drazan, 2000; Kato, 2001; Penin et al., 2004; Brass et al., 2006).

A proteína NS5A, de aproximadamente 56 kDa, é uma fosfoproteína composta de 447 aminoácidos. Foi atribuído à proteína NS5A papel na determinação da resistência das células infectadas pelo HCV à terapia com IFN devido à presença de uma seqüência de aminoácidos na extremidade N-terminal (correspondente às posições 2209–2248 da poliproteína), conhecida como região

determinante de sensibilidade ao interferon (*IFN-sensitive determining region* ou ISDR). Inicialmente, mutações no gene NS5A foram associadas à resposta ao IFN em pacientes com infecção crônica pelo HCV 1b (Enomoto et al., 1995; Enomoto et al., 1996). Posteriormente, demonstrou-se que os mecanismos relacionados a essa ação biológica da proteína NS5A envolvem a sua interação com a proteína PKR por meio do domínio de ligação à PKR (*PKR binding domain* ou PKRBD) – uma proteína quinase que funciona como mediador intracelular da resistência antiviral induzida pelo IFN pela inibição da fosforilação do eIF2, interrompendo, assim, a síntese protéica – bem como a indução da expressão de interleucina 6, uma citocina com reconhecida ação inibitória sobre a atividade antiviral do interferon. O domínio PKRBD corresponde aos aminoácidos das posições 2209–2274 da poliproteína viral. Há, ainda, uma região dentro da NS5A, com alto grau de variabilidade genética, chamada região variável 3 (*Variable region 3* ou V3), correspondendo aos aminoácidos das posições 2356–2379 (Gretch, 2001; Fane et al., 2005). Estudo recente sobre a variabilidade genética da região NS5A, em amostras de soro de pacientes infectados com genótipo 1, revelou que a presença de quatro ou mais mutações no domínio PKRBD foi um fator preditivo de resposta virológica ao final e 24 semanas após o término do tratamento antiviral com IFN peguilado e ribavirina (Muñoz de Rueda et al., 2008).

A proteína NS5B, de aproximadamente 68 kDa, é constituída de 591 aminoácidos e apresenta o domínio Gly-Asp-Asp (correspondente aos aminoácidos das posições 2737-2739 da poliproteína), que é totalmente conservado nas RNA-polimerases dependentes de RNA encontradas em diferentes isolados do HCV e outros vírus com genoma RNA, sendo conferida à mesma uma atividade de RNA-polimerase dependente de RNA. A Figura 2.4 ilustra o processamento das proteínas não estruturais a partir da poliproteína precursora codificada pelo genoma do HCV.

Selby et al. (1993) conseguiram expressar o genoma completo do HCV e, com o uso de soro humano anti-HCV positivo e anticorpos monoespecíficos contra as proteínas codificadas pelo genoma do HCV, identificaram as diferentes proteínas virais, além de determinarem a sua localização intracelular pela técnica de imunofluorescência indireta (IFI). Os padrões de IFI obtidos foram consistentes com uma localização essencialmente extranuclear dessas proteínas, as proteínas NS3 e

NS5B apresentando localização citoplasmática e as demais proteínas localizadas no RE.

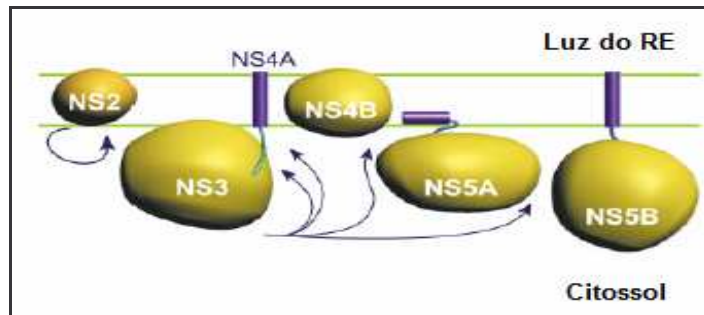


Figura 2.4. Representação esquemática do processamento das proteínas não-estruturais a partir da poliproteína precursora. Observar a ação autocatalítica de NS2-NS3 e sítios de clivagem (setas) do complexo NS3-NS4: NS3/NS4A, NS4A/NS4B, NS4B/NS5A e NS5A/NS5B. RE = retículo endoplasmático; NS2 = proteína não-estrutural NS2; NS3 = proteína não-estrutural NS3; NS4B = proteína não-estrutural NS4B; NS5A = proteína não-estrutural NS5A; NS5B = proteína não-estrutural NS5B. Fonte: Penin F et al (2004, p.6). (Figura adaptada para o português).

O genoma do HCV apresenta também duas regiões não-codificantes, nas extremidades 5' (5'NC) e 3' (3'NC), que flanqueiam a única fase de leitura aberta do genoma viral (Figura 2.5).

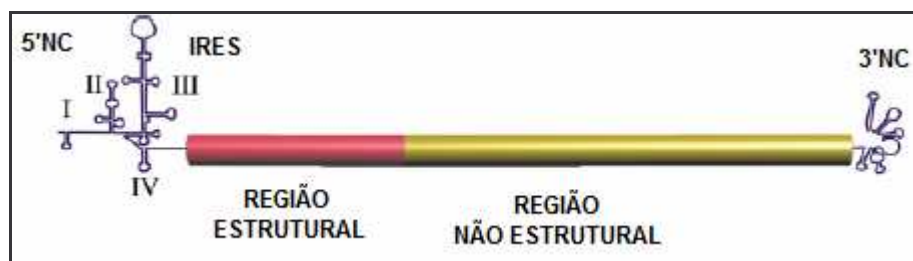


Figura 2.5. Organização genômica do vírus da hepatite C (HCV). Regiões 5' não-codificante (5'NC) e 3' não-codificante (3'NC) flanqueiam a única fase de leitura aberta do genoma do HCV, composta de duas regiões que codificam para proteínas estruturais e não-estruturais. IRES = *internal ribosome entry site*. Fonte: Penin F et al (2004, p.6). (Figura adaptada para o português).

A região 5'NC apresenta aproximadamente 341 nucleotídios, cuja seqüência é altamente conservada entre os diferentes isolados do HCV, sugerindo importante papel funcional na replicação viral e expressão gênica, além de ser considerada apropriada para a seleção de oligonucleotídios iniciadores (ou *primers*) utilizados nos testes de detecção do HCV-RNA pela reação em cadeia da polimerase após síntese de DNA complementar por transcrição reversa (*Reverse transcriptase-polymerase chain reaction* ou RT-PCR) (Han et al., 1990; Choo et al., 1991; Houghton et al., 1991; Bukh et al., 1992). Ao longo da região 5'NC e de um pequeno trecho da extremidade 5' da região codificante (24 a 40 nucleotídios da região core), o genoma do HCV apresenta uma série descontínua de quatro domínios com estruturas secundárias (*Internal ribosome entry site* ou IRES) numerados de I a IV, que desempenham papel importante na ligação do RNA viral à subunidade 40S do ribossomo da célula hospedeira e na iniciação da síntese da poliproteína viral (Figura 2.6). A subunidade 40S é posicionada de tal forma a entrar em contato com o códon de iniciação AUG através dos domínios II e III. A ligação da proteína eIF3 (*Eukaryotic translation initiation factor 3* ou fator eucariótico 3 de iniciação da tradução) ao IRES e à subunidade 40S forma um complexo que permite o contato do códon de iniciação AUG com o anticódon do RNA-t acoplado à metionina. A ligação do IRES é capaz de induzir a alteração conformacional da subunidade 40S que requer o domínio II, indicando que o IRES do HCV possui papel regulador da maquinaria envolvida no processo de tradução de proteínas da célula hospedeira (Lytle et al., 2001; Penin et al., 2004). Na extremidade da região 5'NC, o genoma viral apresenta ainda uma pequena seqüência com estrutura secundária em forma de grampo (Han et al., 1991).

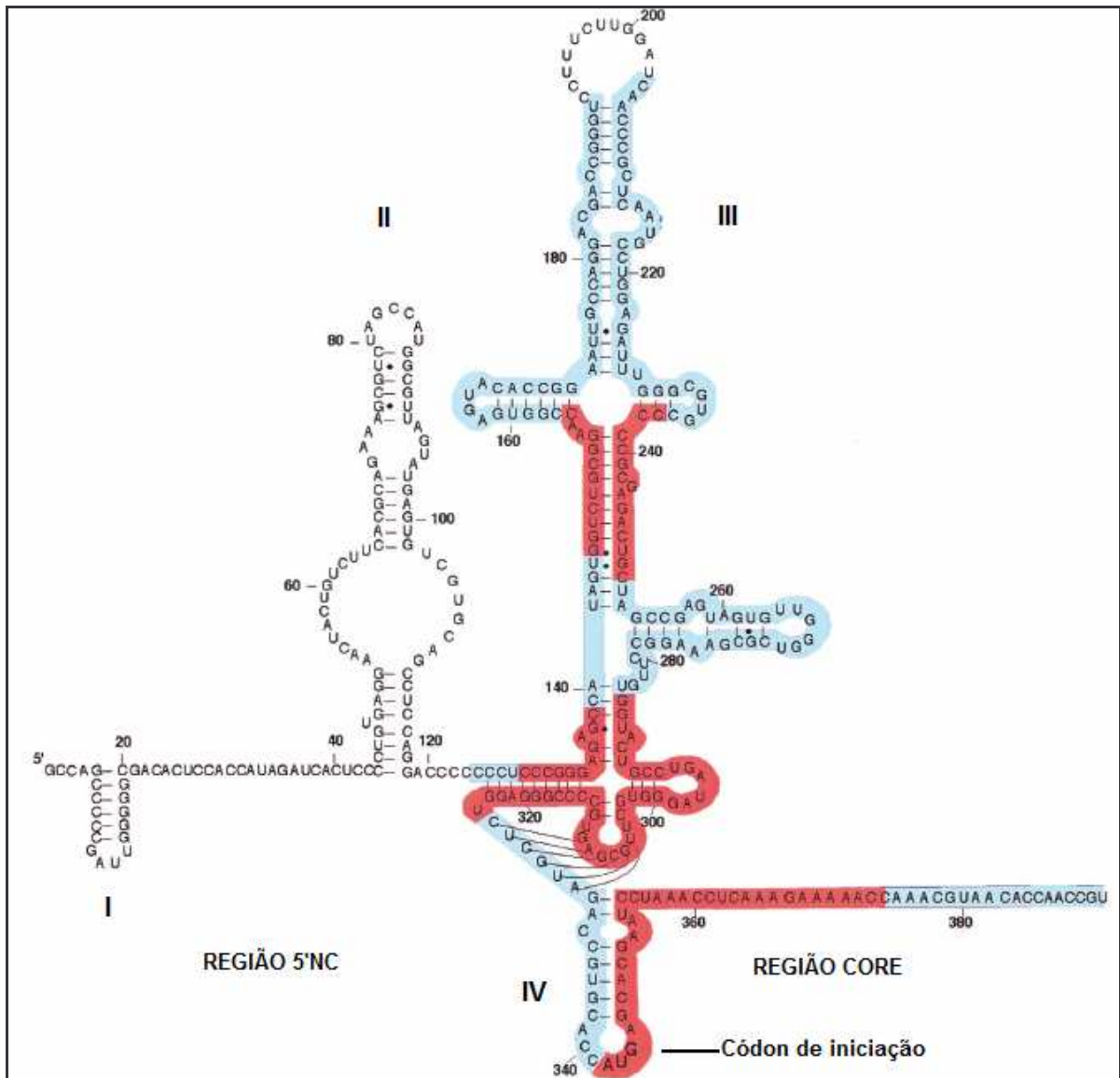


Figura 2.6. Representação esquemática das regiões 5' não codificante (5'NC) e parte do core do HCV, contendo o sítio interno de entrada ribossomal (*Internal ribosome entry site* ou IRES) e seus 4 domínios principais (I, II, III e IV). Em azul, as regiões do IRES protegidas por sítios de ligação no ribossomo. Em vermelho, as regiões do IRES com papel crucial na iniciação da tradução. O códon de iniciação AUG está presente na estrutura secundária (alça) do domínio IV. Fonte: Lytle JR et al. (2001, p.7634). (Figura adaptada para o português).

A região 3'NC do genoma do HCV apresenta estrutura tripartida, sendo constituída por três regiões, dispostas no sentido 5'→3' na seguinte ordem: uma região de cerca de 40 nucleotídios, pouco conservada entre os diferentes isolados do HCV e contendo estruturas secundárias; um trato de polipirimidina (poli-U ou poli-UC) de extensão variável; e uma seqüência de aproximadamente 98 nucleotídios, altamente conservada e contendo estruturas secundárias, chamada cauda X ou 3'X.

(Figura 2.7). A amostra protótipo do HCV (HCV-1) apresenta, entretanto, um trato de poliadenina (poli-A) substituindo o trato de poli-U/UC (Choo et al., 1991; Han et al., 1991). A presença de deleções ou substituições na região 3'NC parece não alterar a estabilidade do RNA ou a tradução, porém ocasiona perda do potencial infectante, sugerindo assim papel muito importante dessa região na replicação viral (Forns e Bukh, 1999; Drazan, 2000; Friebe e Bartenschlager, 2002).

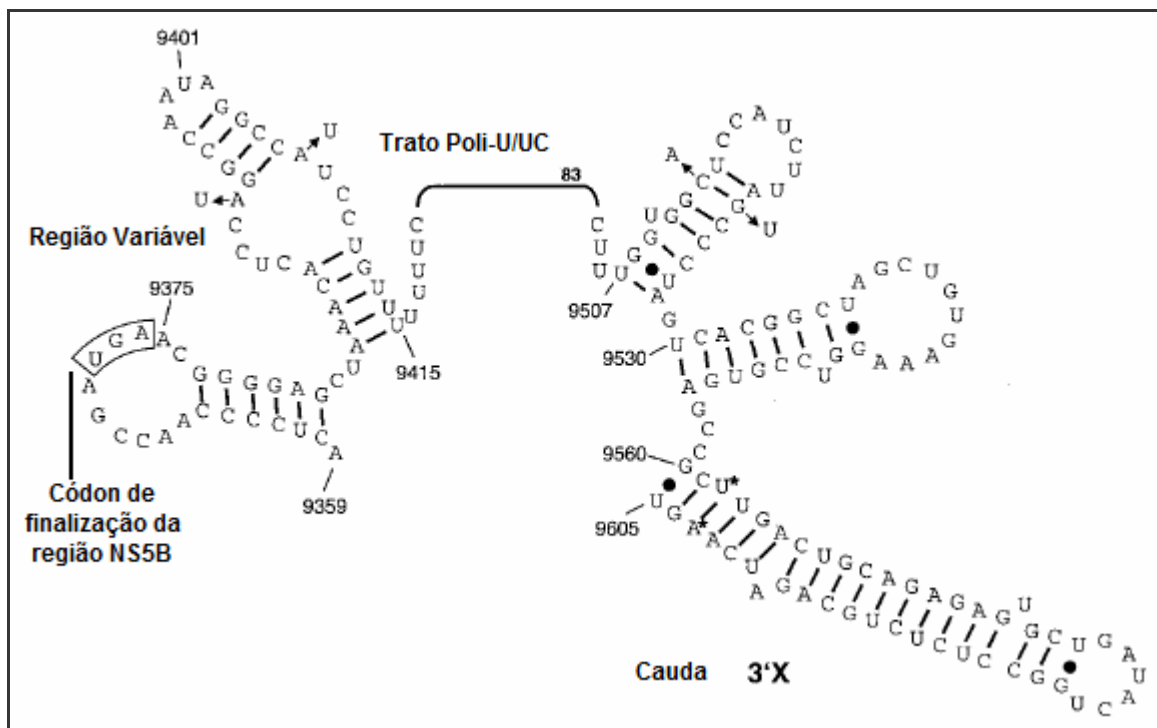


Figura 2.7. Representação esquemática da região 3' não-codificante de um isolado do HCV (HCV Con1; nº de acesso na base de dados EMBL, AJ238799) e sua estrutura tripartida composta das regiões variável, trato poli-U/UC e cauda 3'X. Presença de duas estruturas secundárias ou alças na região variável e três na cauda 3'X. A primeira alça da região variável é antecedida do códon de finalização UGA destacado em caixa. Fonte: Friebe P e Bartenschlager R (2002, p.5327). (Figura adaptada para o português).

2.3 Classificação taxonômica

O HCV compartilha similaridades de organização genômica e estrutura da poliproteína precursora com os pestivírus e flavivírus. As análises comparativas das seqüências nucleotídicas das regiões 5'NC e NS3, bem como o teor de sítios

glicosilados na região do envelope revelaram um grau maior de identidade molecular com os pestivírus (Han et al., 1991; Choo et al., 1991; Bukh et al., 1992). Contudo, a poliproteína do HCV apresenta perfil hidrofóbico similar ao dos flavivírus. Por outro lado, a comparação entre seqüências de aminoácidos ao longo da poliproteína desses vírus revelou um grau limitado de identidade molecular em relação às dos pestivírus e flavivírus (Takamizawa et al., 1991). Dessa forma, de acordo com o Comitê Internacional sobre Taxonomia de Vírus (*International Committee on Taxonomy of Viruses* ou ICTV), o HCV foi classificado como um novo gênero (*Hepacivirus*) dentro da família Flaviviridae, tendo HCV-1 como protótipo da espécie (Robertson et al., 1998; Fauquet e Fargette, 2005).

Os agentes GBV-A, GBV-B e GBV-C/HGV foram incluídos também como membros desta família (Simons et al., 1995; Muerhoff et al., 1995; Linnen et al., 1996). Análises filogenéticas indicaram que, entre os membros da família Flaviviridae, os vírus GB estão mais relacionados ao HCV. A comparação entre as seqüências nucleotídicas das regiões não-codificantes do genoma viral revelou relações mais estreitas do HCV com o GBV-B (Bukh et al., 1997). Atualmente, os vírus HCV e GBV-B são incluídos como membros do gênero *Hepacivirus* (Thiel et al., 2005).

2.4 Aspectos morfológicos e características físico-químicas das partículas do HCV

O vírus da hepatite C foi o primeiro vírus cuja identificação baseou-se quase que integralmente na caracterização de sua seqüência genômica, antes da descrição de sua caracterização morfológica por microscopia eletrônica. Abe et al. (1989) demonstraram a presença de partículas semelhantes a vírus (*Virus-like particles* ou VLPs), esféricas, de 36 a 62 nm, com projeções superficiais, em amostras de soro humano e de chimpanzés com HNANB crônica, bem como no citoplasma de hepatócitos de chimpanzés com HNANB crônica. Além disso, os autores reproduziram HNANB em dois chimpanzés inoculados com a fração do gradiente de sacarose contendo VLPs. Takahashi et al. (1992) mostraram a presença de VLPs esféricas de 55 nm em amostras de plasma de doadores

infectados pelo HCV. Contudo, esses estudos fracassaram em demonstrar a reatividade das VLPs com anticorpos anti-HCV específicos contra a proteína do envelope viral. Kaito et al. (1994), por imunomicroscopia eletrônica utilizando anticorpos monoclonal e policlonal específicos contra a proteína do envelope do HCV, detectaram a presença de partículas (vírions) com distribuição heterogênea quando analisadas em gradiente de densidade de sacarose, provavelmente relacionada à presença de imunocomplexos circulantes nos indivíduos com infecção pelo HCV (Figuras 2.8 e 2.9). Os títulos virais mais elevados foram encontrados em frações de 1,12 – 1,17 g/mL de gradiente de densidade de sacarose (Kaito et al., 1994).

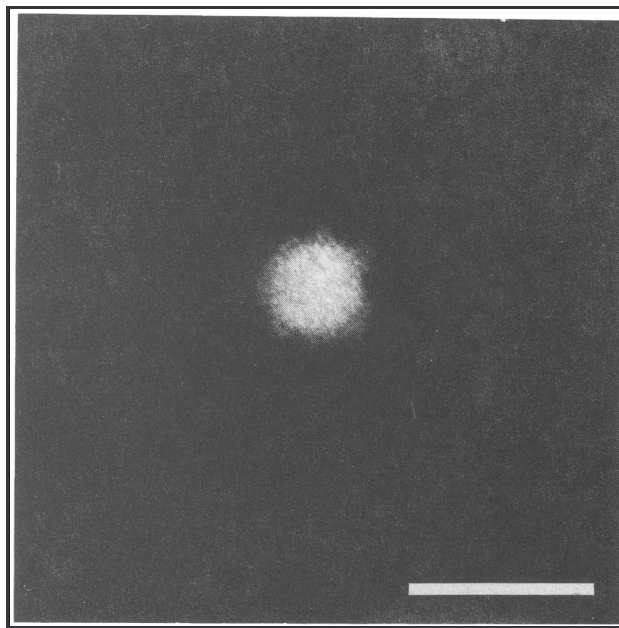


Figura 2.8. Micrografia eletrônica da partícula viral, de 55 a 65 nm de diâmetro, com projeções finas de 6 nm de comprimento, detectada em gradiente de densidade de sacarose de 1,16 g/mL, de doador de sangue anti-HCV +/HCV-RNA +. A barra de escala representa 100 nm. Fonte: Kaito M et al (1994, p.1756).

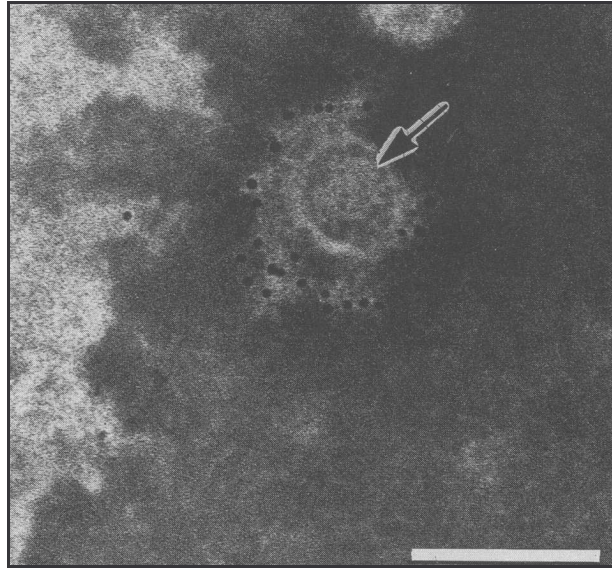


Figura 2.9. Micrografia eletrônica da partícula do vírus da hepatite C, de 55 a 65 nm de diâmetro, visualizada através de imunomicroscopia eletrônica com anticorpos policlonais contra a proteína do envelope viral, em frações de gradiente de densidade de sacarose de 1,12 - 1,16 g/mL, de doador de sangue anti-HCV +/-HCV-RNA +. Agrupamento de partículas de ouro coloidal (indicado com seta) conjugadas com anticorpo secundário na superfície revelando a região interna (core) da partícula viral. A barra de escala representa 100 nm. Fonte: Kaito M et al (1994, p.1757).

As partículas do HCV são esféricas, de 65 a 75 nm de diâmetro, contendo projeções superficiais de aspecto espiculado e de 8 a 15 nm de extensão, características muito semelhantes àsquelas dos flavivírus (Li et al., 1995). Ishida et al. (2001), aplicando a técnica de rotação óptica associada à imunomicroscopia eletrônica, demonstraram que partículas do core possuem densidade de 1,22 – 1,25 g/mL em gradiente de sacarose, de 33 a 40 nm diâmetro e morfologia semelhante à de um icosaedro de simetria hexagonal, cada lado da simetria apresentando aproximadamente 20 nm (Figura 2.10).

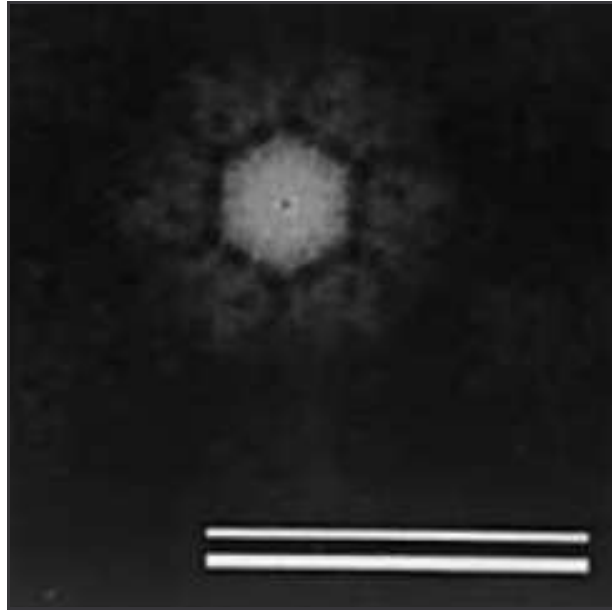


Figura 2.10. Micrografia eletrônica da partícula core do vírus da hepatite C, de 33 a 40 nm de diâmetro, visualizada através de imunomicroscopia eletrônica com anticorpos policlonais contra a proteína do nucleocapsídeo viral, em fração de gradiente de densidade de sacarose de 1,23 g/mL, de plasma de doador de sangue HCV-RNA +. Agrupamento de partículas de ouro coloidal conjugadas com anticorpo secundário na superfície revelando a região interna (core) da partícula viral, de simetria hexagonal, através da rotação óptica. A barra de escala representa 100 nm. Fonte: Ishida S et al (2001, p.342).

Devido à presença do envelope, as partículas do HCV mostram-se sensíveis aos solventes lipídicos como o clorofórmio, o que resulta na perda de sua infecciosidade (Feinstone et al., 1983; Bradley et al., 1985a). Também podem ser inativadas por formol em concentração 1:1000 durante 96 horas a 37°C (Tabor e Gerety, 1980), por aquecimento a 100° C por 5 minutos (Yoshizawa et al., 1982) ou 60° C por mais de 10 horas (Hollinger et al., 1984), por β -propiolactona e radiação ultravioleta (Prince et al., 1984; Prince et al., 1985).

2.5 Diversidade genética do HCV

A grande diversidade genética do HCV é resultante de várias mutações que ocorrem durante a replicação viral e tem implicações epidemiológica, clínica, diagnóstica, terapêutica e prognóstica (Houghton et al., 1991; Bukh et al., 1995; Bréchet, 1996; Bukh et al., 1997; Zein, 2000). Essa diversidade pode ser demonstrada em diferentes regiões do genoma do HCV, sendo mais significativa nas regiões E1 e E2, e, freqüentemente, é acompanhada de alterações na seqüência de aminoácidos das glicoproteínas do envelope. As alterações encontradas no genoma viral, principalmente na região HVR1, durante o curso da infecção, propiciam a emergência de variantes (*quasispecies*) não reconhecidas por anticorpos neutralizantes pré-existentes. Portanto, em um indivíduo infectado pode-se detectar certo grau de heterogeneidade genética entre seqüências de um mesmo genótipo infectante do HCV (Bukh et al., 1995).

Com base na análise filogenética das seqüências nucleotídicas de parte da região NS5 (nucleotídios das posições 7975 a 8196 da amostra protótipo HCV-1, pertencente ao genótipo 1a) do genoma viral, Simmonds et al. (1993) propuseram a classificação do HCV em seis genótipos principais, designados por números arábicos (em ordem de descoberta) de 1 a 6, cada qual podendo ter vários subtipos designados por letras minúsculas (também em ordem de descoberta) a, b, c etc. Todos os genótipos principais podem também ser identificados pelo seqüenciamento nucleotídico da região 5'NC, embora nessa região apenas poucas diferenças na seqüência nucleotídica são observadas entre os genótipos, o que não permite a diferenciação precisa entre os subtipos. De acordo com o grau de similaridade das seqüências da região NS5, as variantes do HCV foram assim classificadas: diferentes isolados do mesmo genótipo apresentam 88 – 99% de similaridade, diferentes subtipos do mesmo genótipo possuem 74 – 86% de similaridade, e diferentes isolados de genótipos distintos possuem 56 – 72% de similaridade nas seqüências nucleotídicas (Simmonds, 1995). Todavia, com base na porcentagem de identidade de seqüência nucleotídica obtida a partir de seqüências inteiras do

genoma viral, o HCV foi distinguido em termos de genótipos (65,7-68,9%), subtipos (76,9-80,1%) e isolados (90,8-99,0%) (Bukh et al., 1995).

A recombinação homóloga entre os genótipos do HCV é descoberta recente que traz implicações para a classificação do HCV. Tal recombinação poderia ser facilmente facilitada por alguns fatores como: sobreposição de distribuição geográfica dos genótipos do HCV em diferentes partes do mundo, natureza do comportamento de risco (por exemplo, o compartilhamento repetido de utensílios entre usuários de drogas endovenosas) e falta de imunidade protetora durante a infecção crônica pelo HCV. Atualmente, a frequência da recombinação entre diferentes genótipos do HCV pode estar sendo subestimada, uma vez que poderia ser difícil a sua caracterização quando da ocorrência entre isolados do mesmo subtipo. Além disso, a análise comparativa entre as seqüências do HCV é freqüentemente realizada pelo estudo de regiões subgenômicas, ao invés do genoma inteiro (Simmonds et al., 2005).

2.6 Distribuição geográfica dos genótipos e subtipos do HCV

Os genótipos do HCV apresentam diferenças significativas na distribuição em todo o mundo, sendo os genótipos 1, 2 e 3 com distribuição mundial e, os demais, restritos a certas áreas. Os subtipos 1a, 1b, 2b e 3a são os mais comuns dentre isolados dos EUA e Europa ocidental, ao passo que os subtipos 1b, 2a e 2b são mais freqüentes no Japão e Taiwan (McOmish et al., 1994; Zein et al., 1996). No Oriente Médio (Kuait e Arábia Saudita), no Egito, e na África Central (República Democrática do Congo e Gabão) há predominância do genótipo 4. Na África do Sul, o genótipo 5 é o mais prevalente, e o genótipo 6 predomina em países como China, Taiwan, e do sudeste asiático como Cingapura, Malásia, Vietnã e Tailândia (Nguyen e Keeffe, 2005).

No Brasil, os estudos referentes à distribuição dos genótipos foram realizados em indivíduos pré-doadores de sangue ou de base hospitalar. Na Região Centro-Oeste, os genótipos 1 (60,9% a 67,9%) e 3 (29,1% a 39,1%) foram os mais prevalentes em pré-doadores de sangue (Martins et al., 1998; 2000; 2006; Amorim

et al., 2004). Na Região Sudeste, estudos prévios demonstraram maior prevalência para os genótipos 1 e, em menor proporção, o genótipo 3 (Stuyver et al., 1993; Holland et al., 1996; Martins et al., 1998). Recentemente, Oliveira et al. (2007) estudaram a prevalência dos genótipos do HCV em uma coorte de 3670 pacientes em programa de avaliação pré-terapêutica em unidades de referência do Rio de Janeiro, durante o período de 2000-2007, e observaram prevalência mais alta para os genótipos 1 (82,2%) e 3 (15,9%). Em São Paulo, os genótipos mais prevalentes foram 1 e 3, subtipos 1b (33,8%), 3a (30,8%) e 1a (21,5%) (Bassit et al., 1999a). Em Minas Gerais, a distribuição dos genótipos do HCV em grupo de pacientes com doenças hematológicas, a maioria representada por hemofílicos, revelou que 84,1% e 13,6% dos pacientes apresentavam genótipos 1 e 3, respectivamente (Oliveira GC et al., 1999). Os genótipos 1 e 3 (subtipos 1a, 1b e 3a) foram os mais prevalentes em Salvador, Bahia. Contudo, prevalência considerada mais alta para o subtipo 3a (21,7% a 35,3%) foi registrada em relação aos dados da Região Sudeste (Martins et al., 1998; Silva et al., 2000; Paraná et al., 2000; Code et al. 2003). Na Região Sul, também foi observada freqüência mais elevada para o genótipo 3 em comparação aos dados da Região Sudeste. No Rio Grande do Sul, os genótipos 1 (47,5 %), 3 (44,5 %) e 2 (8 %) foram os mais prevalentes (Krug et al., 1997). Em Santa Catarina, os genótipos mais freqüentemente encontrados foram 1 (51 %), 3 (46,1 %) e 2 (2,9 %) (Silva et al., 2007). A presença dos genótipos 4 (Bassit et al., 1999b; Oliveira ML et al., 1999; Carmo et al., 2002; Lampe et al., 2002; Zarife et al., 2006) e 5 foram raramente relatadas no Brasil (Levi et al., 2002).

Estudo retrospectivo foi realizado no período de setembro a outubro de 2002, com base na revisão de prontuários médicos de 4996 pacientes com hepatite C crônica, atendidos em 14 instituições públicas e privadas do País. A análise dos dados dos 27% (1348) pacientes que dispunham de informações sobre genotipagem revelou a seguinte distribuição: 64%, 33% e 3% para os genótipos 1, 3 e 2, respectivamente (Focaccia et al., 2004). Recentemente, Campiotto et al. (2005) estudaram 1688 amostras de soro pela técnica de seqüenciamento nucleotídico, provenientes de pacientes infectados pelo HCV de todas as cinco macro-regiões geográficas do Brasil. Esse estudo demonstrou que os genótipos mais prevalentes foram 1 (64,9%), 3 (30,2%), 2 (4,6%), 4 (0,2%) e 5 (0,1%). Além disso, a distribuição

dos genótipos foi significativamente diferente entre as macro-regiões. O genótipo 1 foi o mais prevalente em todas as áreas estudadas e o genótipo 3 foi mais prevalente na Região Sul do País, ratificando resultados de estudos anteriores (Krug et al., 1997; Bassit et al., 1999a; Silva et al., 2007).

2.7 Mecanismos de replicação do HCV

A falta de um sistema eficiente de replicação *in vitro* que permita a propagação do HCV em cultivo celular, por período prolongado, bem como a presença de baixos títulos virais no soro vem dificultando o conhecimento sobre as diferentes etapas de sua replicação. Os sistemas mais utilizados requerem infecção de linhagens celulares derivadas de células mononucleares do sangue periférico ou de origem hepática pelo HCV, ou transfecção de linhagens celulares com seqüências genômicas clonadas do HCV (Bartenschlager e Lohmann, 2000; Drazan, 2000). Os mecanismos que controlam a adsorção da partícula viral e possibilitam a entrada do HCV na célula hospedeira humana são pouco conhecidos (Favre e Muellhaupt, 2005). Contudo, diversas moléculas de superfície celular foram sugeridas como prováveis receptores para o HCV no processo de adsorção da partícula viral à célula hospedeira, tais como:

a) CD81

A molécula CD81 é uma proteína transmembrana da superfamília das tetraspaninas, com quatro domínios transmembrana, dois domínios extracelulares com estruturas secundárias em forma de alças, e domínios N-terminal e C-terminal intracelulares (Figura 2.11). A molécula CD81 é uma proteína não-glicosilada, de aproximadamente 26 kDa e expressa em vários tipos celulares, incluindo hepatócitos, linfócitos B e T, monócitos, fibroblastos e células endoteliais; plaquetas, no entanto, não expressam o fenótipo CD81 (Levy et al., 1998; Kipps et al., 2001). A

função da molécula CD81 como ligante do HCV está fundamentada na interação do seu principal domínio extracelular (alça maior) com a glicoproteína do envelope (E2), interação que pode ser bloqueada por anticorpos neutralizantes anti-E2 (Pileri et al., 1998; Drummer et al., 2002). O polimorfismo da molécula CD81 parece contribuir, pelo menos parcialmente, para maior ou menor suscetibilidade ao HCV (Flint et al., 2007). A ligação da glicoproteína E2 do HCV à molécula CD81 parece variar em eficiência em relação aos diferentes isolados dos subtipos 1a e 1b do HCV, e envolver uma complexa interação entre as duas regiões hipervariáveis (HVR1 e HVR2) da proteína E2 (Roccasecca et al., 2003).

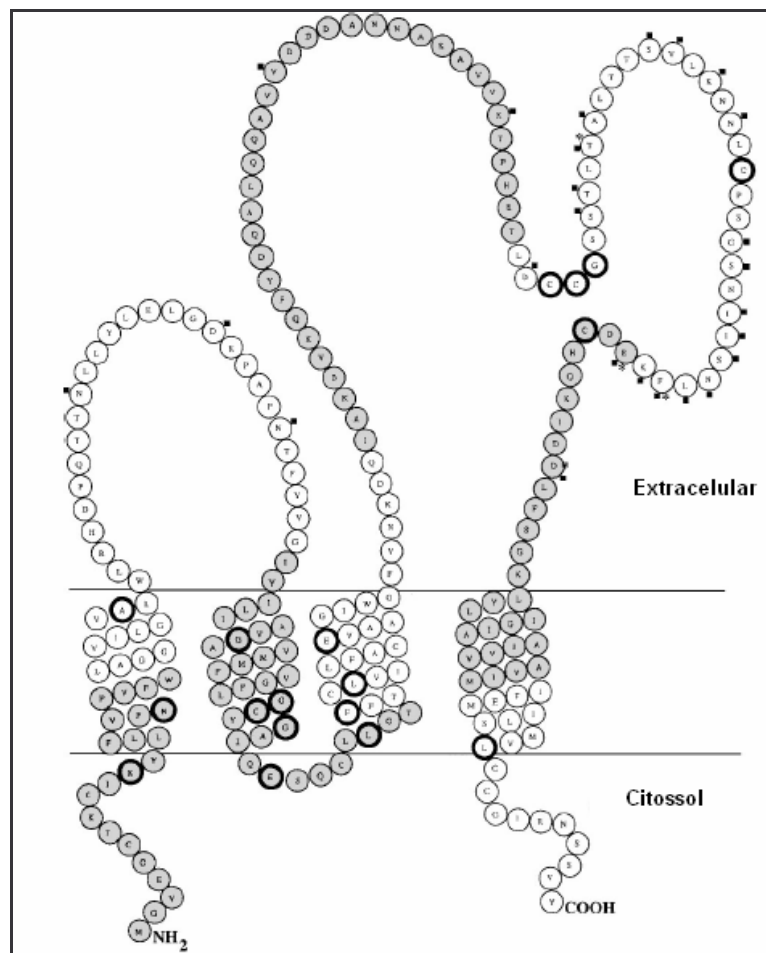


Figura 2.11. Representação esquemática do modelo estrutural da molécula CD81, com dois domínios extracelulares e suas extremidades N-terminal (NH₂) e C-terminal (COOH) no citossol. Aminoácidos são apresentados como unidades circulares designados por letra única em seu interior. Fonte: Levy S et al. (1998, p. 91). (Figura adaptada para o português).

b) RECEPTOR DA LIPOPROTEÍNA DE BAIXA DENSIDADE (*Low density lipoprotein* ou LDL).

Observações anteriores demonstraram que as partículas circulantes do HCV poderiam estar complexadas às lipoproteínas plasmáticas (Kaito et al., 1994; Li et al., 1995). Estudos subseqüentes (Agnello et al., 1999; Monazahian et al., 1999) evidenciaram que a endocitose das partículas do HCV poderiam ser mediadas por sua ligação ao receptor para LDL de diferentes linhagens celulares cultivadas *in vitro*. Contudo, Triyatni et al. (2002), em experimentos com linhagens celulares distintas (HepG2 e Molt-4), demonstraram ser a adsorção e a internalização de partículas virais semelhantes ao HCV eventos iniciais independentes dos mecanismos ligados à molécula CD81 e ao receptor de LDL.

c) SR-BI (*Scavenger receptor class B type I*)

A molécula SR-BI é composta de 509 aminoácidos e apresenta 60% de similaridade da seqüência de aminoácidos com a molécula CD36, sendo membro da superfamília CD36, que inclui moléculas de superfície celular que se associam aos diferentes ligantes, incluindo lipoproteínas. Contudo, ambos os receptores possuem distribuição distinta em diferentes tipos celulares: SR-BI é altamente expresso em hepatócitos e tecidos envolvidos no metabolismo lipídico, enquanto que CD36 é expresso principalmente em plaquetas, macrófagos e células endoteliais. Experimentos utilizando linhagens celulares derivadas de hepatoma humano (HepG2) – que não expressam CD81 em sua superfície –, identificaram o SR-BI como receptor responsável pela ligação da glicoproteína E2 do HCV à célula (Scarselli et al., 2002). Assim como nos hepatócitos humanos, células dendríticas também apresentam níveis elevados de expressão da molécula SR-BI em sua superfície. O SR-BI possui papel importante na entrada do HCV, bem como na apresentação de antígenos virais pelas células dendríticas (Barth et al., 2008).

d) FIBRONECTINA

A detecção do HCV em plaquetas do sangue periférico foi demonstrada pela RT-PCR em diferentes estudos (Silva et al., 1992; Nagamine et al., 1996; Hamaia et al., 2001). A fibronectina (FN) é uma proteína de aproximadamente 240 kDa, composta de duas subunidades, podendo ser detectada no plasma, na matriz extracelular subendotelial e nos grânulos-alfa presentes no interior das plaquetas. Após ativação plaquetária, a FN é liberada a partir dos grânulos-alfa, o que facilita sua ligação a diferentes proteínas. A FN apresenta a seqüência RGD (Gly-Arg-Gly-Asp-Ser), que funciona como sítio de ligação para integrinas (α IIb β 3 e α 5 β 1) – proteínas transmembrana que participam da ligação do citoesqueleto com a matriz extracelular –, permitindo assim a adesão das plaquetas (Parise et al., 1999). Pugliese et al. (2004) demonstraram que a adição do oligopeptídeo RGD às plaquetas utilizadas para ensaios de adsorção viral foi capaz de inibir a infecção de linhagens celulares susceptíveis ao HCV como a THP-1, sugerindo que a FN pode estar envolvida na interação entre HCV e plaquetas.

e) GLICOPROTEÍNA PLAQUETÁRIA (GP) VI

A GPVI, de aproximadamente 60 kDa, é uma proteína que está diretamente envolvida na interação colágeno-plaquetas durante a ativação plaquetária, sendo expressa exclusivamente em plaquetas e seus precursores (megacariócitos). A GPVI é uma proteína transmembrana da superfamília das imunoglobulinas e possui dois domínios extracelulares tipo imunoglobulina (D1D2) na extremidade N-terminal da cadeia (Jandrot-Perrus et al., 2000). Zahn et al. (2006) demonstraram que entre 2 – 7% das partículas do HCV podem se ligar de forma específica, através da glicoproteína E2, aos domínios D1D2 da GPVI humana, ligação essa que pode ser inibida pela presença de anticorpos específicos anti-D1D2. Além disso, foi observado que esses domínios são necessários para uma ligação mais eficiente da GPVI humana com partículas do HCV.

Outras moléculas potencialmente envolvidas na entrada do HCV na célula hospedeira foram estudadas. As lectinas tipo C (*Liver and lymph node-specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing nonintegrin* ou L-SIGN, e *Dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing nonintegrin* ou DC-SIGN) são proteínas transmembrana formadas de homotetrâmeros, com uma região C-terminal extracelular que contém um domínio que reconhece sítios de glicosilação. Além de constituírem receptores de adesão intercelular, as lectinas tipo C podem funcionar como receptores capazes de se ligar e, subseqüentemente, internalizar uma variedade de patógenos, incluindo vírus, bactérias, fungos e parasitos. Também foi atribuído às glicosaminoglicanas presentes na superfície das células um papel inicial na adsorção do HCV à célula hospedeira, após o que partículas virais seriam transferidas para um segundo receptor, de maior afinidade, resultando na internalização do HCV (Barth et al., 2006; Bartosch e Cosset, 2006; Cocquerel et al., 2006; Diedrich, 2006).

Estudos mais recentes sugerem que a entrada do HCV em hepatócitos depende da sua interação com o receptor CD81 e um provável segundo receptor. A proteína claudina-1, um componente presente nas junções oclusivo e altamente expresso em células hepáticas, foi identificada como co-receptor necessário na etapa mais tardia do processo de internalização da partícula viral em linhagens celulares derivadas de hepatoma humano. Também foi demonstrado que a expressão de claudina-1 em linhagens celulares não-hepáticas foi capaz de conferir suscetibilidade ao HCV (Evans et al., 2007; Harris et al., 2008).

A internalização do HCV após sua ligação ao receptor celular requer a formação de vesículas cobertas por clatrina, com subseqüente transferência para endossomos precoces (Meertens et al., 2006). Por mecanismos ainda pouco conhecidos, a acidificação do meio endossomal contribui para o processo de fusão entre o envoltório viral (via glicoproteínas) e as membranas celulares, resultando na liberação do nucleocapsídeo para o citossol da célula hospedeira (Moradpour et al., 2007; Pawlotsky et al., 2007; Tellinghuisen et al., 2007).

Presume-se que, após a dissociação do nucleocapsídeo, o genoma viral seja exposto no citossol e liga-se aos ribossomos para a síntese da poliproteína que é clivada por proteases, fornecendo pelo menos 10 proteínas, incluindo a NS5B, uma

RNA-polimerase dependente de RNA. A replicação do HCV procede via síntese de fitas simples de RNA complementar, de polaridade negativa, designadas replicativos intermediários. Em seguida, os replicativos intermediários servem de molde para a síntese de fitas positivas que constituirão novos RNAs, os quais serão incorporados às novas partículas virais. A enzima responsável por essas duas etapas é a NS5B, que tem atividade de RNA-polimerase dependente de RNA (Moradpour et al., 2007). A síntese do RNA do HCV pela NS5B ocorre na ausência de uma seqüência inicial de RNA ou *primer* (*de novo*). A NS5B é uma proteína ancorada à membrana por uma cauda que apresenta seqüência de 21 aminoácidos na sua extremidade C-terminal (Forns e Bukh, 1999; Drazan, 2000; Penin et al., 2004).

Recentemente, foi descrito um complexo replicativo do HCV associado às membranas do RE da célula hospedeira situadas na área justanuclear, chamado rede membranosa, composto de membranas com modificações morfológicas nas quais podem ser identificadas diferentes proteínas virais e moléculas de RNA em processo de replicação (Figura 2.12) (Penin et al., 2004; Brass et al., 2006).

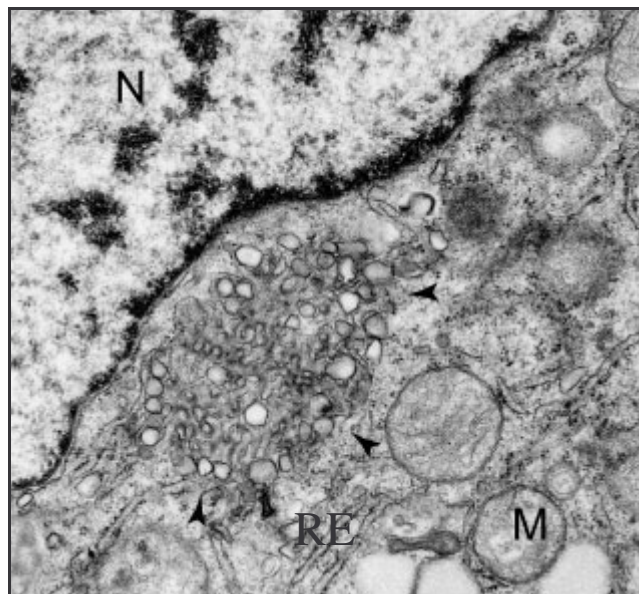


Figura 2.12. Micrografia eletrônica da rede membranosa (complexo replicativo do vírus da hepatite C) em linhagens celulares derivadas de hepatoma humano (Huh-7). A barra de escala representa 500 nm. N, núcleo; RE, retículo endoplasmático; M, mitocôndria. Fonte: Penin F et al (2004, p. 15). (Figura adaptada para o português).

As etapas finais do ciclo replicativo do HCV (formação do nucleocapsídeo, a montagem e a liberação de vírions infecciosos) não são bem conhecidas. A formação da partícula viral pode ser iniciada pela interação da proteína core com o RNA viral. Essa proteína também se associa as outras moléculas core e as seqüências necessárias para essa interação estão localizadas em um trecho de 115 aminoácidos da extremidade N-terminal, onde foi identificado um domínio rico em triptófano entre os resíduos das posições 82 e 101 (Bartenschlager e Lohmann, 2000). Em relação ao(s) sítio(s) presumido(s) de montagem das partículas virais, sabe-se que, no interior do RER, as proteínas E1 e E2 podem formar heterodímeros por meio de ligações não-covalentes. A presença de sinal de retenção representado pelos últimos 29 aminoácidos da extremidade C-terminal na proteína E2 sugere que a montagem inicial dos vírions possa ocorrer nesse compartimento celular. Além disso, ambas as proteínas apresentam domínios em sua extremidade C-terminal que permitem sua ancoragem às membranas celulares (Forns e Bukh, 1999). As proteínas estruturais também foram detectadas no complexo de Golgi, sugerindo que ambos os compartimentos celulares (RE e complexo de Golgi) podem estar envolvidos na maturação das partículas virais. Os mecanismos de liberação dos vírions a partir das células infectadas, embora obscuros, provavelmente envolvem a via secretora constitutiva (por exocitose). O envelope viral é formado por uma bicamada lipídica derivada do sistema de membranas celulares, contendo proteínas apenas codificadas pelo genoma viral (Favre e Muellhaulpt, 2005; Diedrich, 2006; Moradpour et al., 2007; Pawlotsky et al., 2007; Tellinghuisen et al., 2007).

O conhecimento pormenorizado sobre as diferentes etapas do ciclo replicativo do HCV torna-se mais relevante na medida em que diferentes alvos podem ser encontrados para o desenvolvimento de novos medicamentos antivirais (Pawlotsky et al., 2007). A Figura 2.13 ilustra as principais etapas da replicação do HCV.

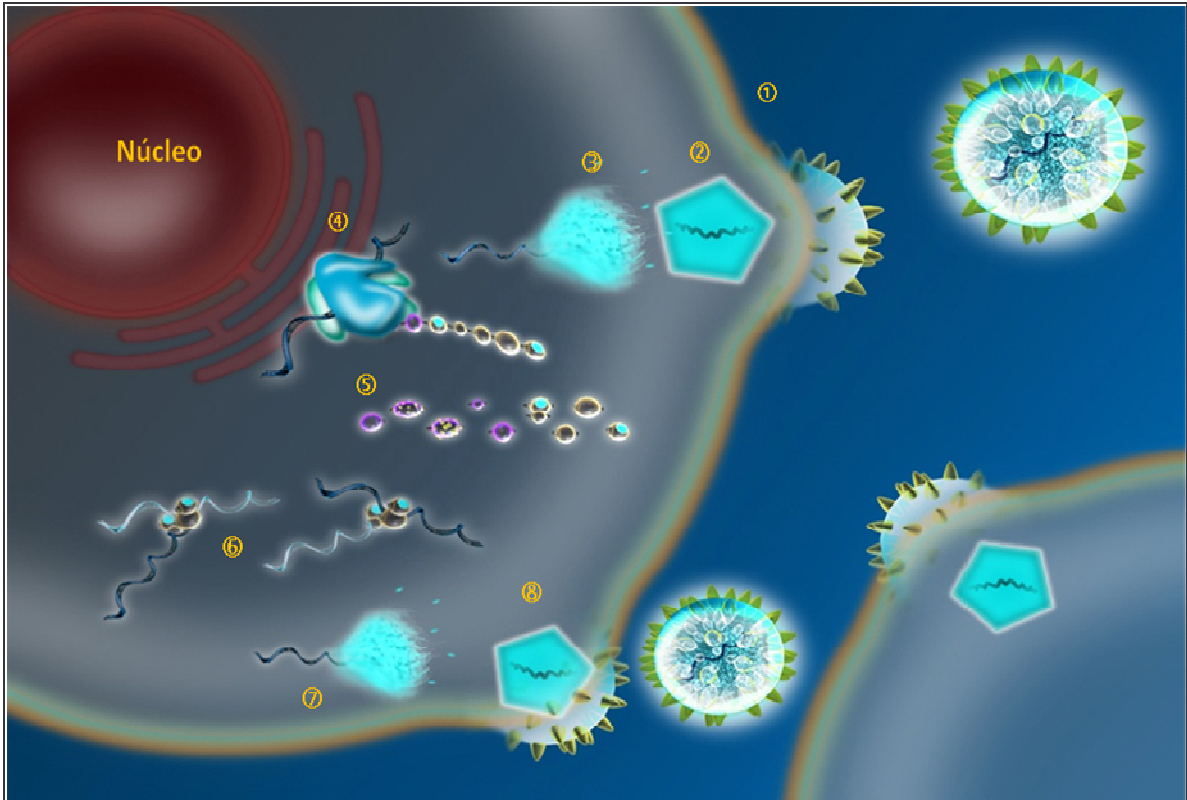


Figura 2.13. Representação esquemática das principais etapas da replicação do vírus da hepatite C. ①, adsorção da partícula viral; ②, internalização da partícula viral via endocitose; ③, disassociação do capsídeo viral; ④, síntese da poliproteína precursora após tradução do RNA viral; ⑤, clivagem da poliproteína precursora; ⑥, replicação do RNA viral; ⑦, montagem da partícula viral; ⑧, maturação e exocitose da partícula viral. Fonte: Pawlotsky JM e Gish RG (2006, p.6). (Figura adaptada para o português).

2.8 Mecanismos de persistência da infecção pelo HCV

O genoma do HCV apresenta elevado grau de heterogeneidade genética decorrentes de mutações que ocorrem durante a replicação viral, resultando no aparecimento de variantes distintas, porém muito relacionadas, em um mesmo indivíduo infectado, denominadas *quasispecies*, que favorecem o seu escape da resposta imunológica do hospedeiro. As regiões E1 e E2 do genoma viral exibem as maiores taxas de mutação, bem como as seqüências de aminoácidos correspondentes (Bukh et al., 1995). Entretanto, o acúmulo de mutações na região HVR1 decorrente da pressão imunológica do hospedeiro provoca alterações de

epítomos reconhecidos por linfócitos B e células T durante o curso da infecção pelo HCV, e parece assumir papel preponderante no escape dos anticorpos neutralizantes e das células T citotóxicas (Kato, 2000). A expressão das proteínas E1 e E2 na superfície celular é muito limitada, o que pode também explicar o escape das células infectadas do reconhecimento pelas células do sistema imune (Pavio e Lai, 2003). Outro fator que contribui para essa alta taxa de mutação é o fato de a RNA-polimerase dependente de RNA não ser enzima dotada de alta fidelidade no processo de replicação, já que é capaz de adicionar bases nitrogenadas que pareiam incorretamente sem que haja reparo molecular (Bukh et al., 1995; Forns e Bukh, 1999; Drazan, 2000).

Outro mecanismo proposto que poderia desempenhar papel importante na persistência da infecção seria a permanência do HCV em locais extra-hepáticos, como várias células do tecido hematopoético, que funcionariam como reservatórios, sítios de replicação ou ambos (Hadziyannis, 1997; Alter, 2001). A compartimentalização do HCV é definida como a distribuição não-randômica de *quasispecies* entre os diferentes locais de detecção do HCV, principalmente hepatócitos, células mononucleares do sangue periférico e plasma, característica que também pode contribuir para a persistência da infecção viral (Roque-Afonso et al., 1999; Ducoulombier et al., 2004; Roque-Afonso et al., 2005; Zehender et al., 2005; Di Liberto et al., 2006). Hamaia et al. (2001) estudaram a dinâmica da ligação do HCV às plaquetas e a duas linhagens de células mononucleares (Molt-4 e U937), demonstrando que apenas 5% das partículas do HCV circulam como partículas não-complexadas. A maior parte dos vírions circula ligada à IgG e apenas 1% dos vírions circulantes encontram-se ligados às células. As partículas livres e complexadas do HCV ligam-se em proporções aproximadamente iguais às plaquetas. A interação do HCV com a fração plasmática da LDL parece exercer papel importante na replicação e persistência viral em virtude da captação das moléculas de LDL pelos hepatócitos via receptor de LDL (Drazan, 2000). Além das lipoproteínas e imunoglobulinas, as partículas do HCV podem circular de forma complexada a outras moléculas como crioglobulinas, desempenhando papel importante no transporte e subsequente captação de partículas virais pelos tecidos, bem como na persistência viral (Hilgard et al., 2005).

A interação de proteínas do HCV com citocinas também vem sendo alvo de pesquisas. A proteína core, por exemplo, é capaz de interagir com a cauda citoplasmática do receptor da linfotoxina beta – uma proteína da família do fator de necrose tumoral e envolvida em uma das vias de sinalização da apoptose –, sugerindo função imunomoduladora no processo de persistência do HCV (Drazan, 2000). A infecção de células mononucleares do sangue periférico pelo HCV pode resultar em alterações imunológicas relacionadas às funções de células dendríticas, células T, células NK e células B, inclusive levando ao desenvolvimento de doenças linfoproliferativas malignas (Pavio e Lai, 2003; Landau et al., 2007).

2.9 Modos de transmissão

A principal via de transmissão do HCV é a parenteral, embora possa ser detectado em vários fluidos corporais humanos, como saliva, urina, líquido ascítico, lavado broncoalveolar, leite materno, suor, sêmen e secreções vaginais (Liou et al., 1992; Ackerman et al., 1998; Idilman et al., 2002; Ortiz-Movilla et al., 2002). Na atualidade, grande parte dos indivíduos infectados é representada por usuários de drogas ilícitas injetáveis e/ou intranasal, e receptores de sangue, componentes ou derivados. Cerca de 65% dos usuários de drogas ilícitas injetáveis são infectados pelo HCV no primeiro ano a partir do início do uso das drogas (Lo Re e Kostman, 2005). O estudo de Mathei et al. (2006) forneceu evidências que suportam papel importante do compartilhamento da parafernália – que não agulhas e seringas – na disseminação da hepatite C entre usuários de drogas injetáveis.

A transmissão do HCV por procedimentos transfusionais apresenta importância histórica, já que a instituição de medidas visando à mudança de perfil dos doadores de sangue como a exclusão de doadores remunerados ou com história de promiscuidade sexual, e a incorporação de marcadores sorológicos substitutos (como ALT e anti-HBc) como testes de exclusão em bancos de sangue durante as décadas de 70 e 80, e, principalmente, a implantação do teste anti-HCV

como teste de triagem sorológica rotineira nos bancos de sangue a partir de 1989, contribuiu para redução drástica na taxa de incidência de hepatite C pós-transfusional ao longo da última década (Alter et al., 1998; Yen et al., 2003). Assim, o risco de HPT relacionada ao HCV pôde ser estimado em 9,7 casos por 1.000.000 unidades transfundidas quando a testagem baseia-se na detecção de anticorpos anti-HCV (ensaios imunoenzimáticos de 2ª geração), e 2,7 casos por 1.000.000 unidades transfundidas quando é utilizada a metodologia de amplificação de ácidos nucléicos (*Nucleic acid tests* ou NAT) na maioria dos países desenvolvidos (Schreiber et al., 1996). Esse risco parece ser menor quando se trata de transfusões de produtos celulares, sendo estimado em 1 caso para 100.000 transfusões (van der Poel, 1999). Como resultado da adoção de medidas de prevenção primária na população em geral e da aplicação de métodos mais sensíveis em bancos de sangue, observou-se redução ainda maior da taxa de risco residual de HPT associada ao HCV, sendo inferior a 1 caso por 1.000.000 de doações de sangue na maioria dos países desenvolvidos (Prati, 2006).

No Brasil, por meio da Portaria nº 1376, de 19 de novembro de 1993, o MS tornou obrigatória a realização do teste anti-HCV na triagem sorológica para pesquisa do HCV em todas as unidades de sangue coletadas. Com o objetivo de reduzir ainda mais o risco de transmissão do HCV por transfusão de sangue e hemoderivados, o MS, por meio da Portaria nº 262, de 5 de fevereiro de 2002, tornou obrigatória a incorporação de técnicas de amplificação de ácidos nucléicos – NAT – para HCV em todas as amostras de sangue de doadores, e fixou prazo de seis meses a partir da data dessa Portaria, para a implantação do NAT nos hemocentros coordenadores de referência do Sistema Único de Saúde e nos serviços privados. Essa Portaria foi revogada em 1º de agosto de 2002, por meio da Portaria nº 1407, e um novo prazo de seis meses a partir da data dessa última foi fixado para a testagem pelo NAT em todas as amostras de sangue de doadores. Contudo, considerando a impossibilidade da implantação simultânea e imediata do NAT em todos os serviços de hemoterapia, o MS, por meio da Portaria nº 79, de 31 de janeiro de 2003, fixou prazo de 12 meses a partir da data dessa última, para que todo o sangue coletado para uso transfusional no País seja testado pelo NAT. A Portaria nº 112, de 29 de janeiro de 2004, determinou a implantação gradativa do

NAT para HCV, no âmbito da Hemorrede Nacional, nas amostras de sangue de doadores, a primeira etapa ocorrendo em número restrito de Serviços de Hemoterapia. A partir da sua implantação, essa primeira etapa deverá ser monitorada e avaliada para que, ao final de 12 meses, forneça dados suficientes para definir estratégias subseqüentes para utilização da tecnologia. Recentemente, por meio da Portaria nº 463, de 30 de junho de 2004, foi instituído o Grupo Técnico para estabelecimento de critérios necessários à obtenção de autorização temporária para realização de NATs não-comerciais para HCV na rotina dos Serviços de Hemoterapia.

Indivíduos que receberam transplante de órgãos de doadores anti-HCV positivos representam um grupo de risco bem definido (Pereira et al., 1991).

Em pacientes hemodialisados foi encontrada prevalência aumentada da infecção pelo HCV, variando de 10% a 52% entre diferentes unidades de hemodiálise (HD). A detecção do HCV-RNA pode ser demonstrada em 5% dos pacientes anti-HCV negativos que estão em hemodiálise. Os níveis de aminotransferases podem ser normais em aproximadamente 70% dos pacientes em hemodiálise, incluindo aqueles com viremia detectável. A freqüência e duração em anos das sessões de HD parecem aumentar o risco de transmissão nosocomial do HCV, particularmente em unidades onde práticas inadequadas de controle de infecção ainda persistam (Vanderborght et al., 1995; Heintges e Wands, 1997; Memon e Memon, 2002; Souza et al., 2003; Lampe et al., 2008). A transmissão nosocomial do HCV também foi registrada em clínicas de Hematologia/Oncologia onde técnicas assépticas não foram rigorosamente adotadas pelos profissionais de saúde. A adoção de medidas de controle de infecção mostrou ser efetiva em reduzir a transmissão nosocomial desse vírus em tais ambientes (Silini et al., 2002; Macedo Carneiro et al., 2005; de Oliveira et al., 2005).

Contudo, 15% a 40% dos indivíduos infectados não apresentam fatores de risco parenteral identificados na sua história epidemiológica, configurando casos esporádicos da infecção e, nesses, a transmissão do HCV pode estar relacionada à transmissão perinatal, sexual e/ou intrafamiliar por meio de vários fluidos corporais (Ackerman et al., 1998; Karmochkine et al., 2006). A transmissão perinatal, provavelmente, ocorre com maior freqüência, durante o trabalho de parto ou no

momento da expulsão do feto. A taxa de infecção após a exposição perinatal é baixa (0 % a 7 %), porém pode chegar a 22% se houver coinfeção pelo vírus da imunodeficiência humana (*Human immunodeficiency virus* ou HIV) e títulos elevados de HCV-RNA no sangue materno. Embora a detecção de HCV-RNA no leite materno tenha sido reportada, não há evidências que garantam aumento do risco de transmissão vertical do HCV pelo aleitamento materno, exceto quando houver fissuras ou sangramentos nos mamilos (Heintges e Wands, 1997; Oliveira, 2001; Dal Molin et al., 2002; Roberts e Yeung, 2002).

A transmissão sexual desempenha papel de menor importância na epidemiologia da infecção, em média 2,4% a 5% naqueles indivíduos sem outros fatores de risco independentes (Alter et al., 1998; Herrine e Weinberg, 1999; Cavalheiro, 2007). O risco de transmissão sexual do HCV aumenta para 9% em parceiros heterossexuais se houver coinfeção pelo HIV. Também parece ser maior em indivíduos com múltiplos parceiros sexuais, prática sexual de risco acrescido como intercurso sexual anal receptivo, desprotegido ou com trauma, e história de doença sexualmente transmissível (Heintges e Wands, 1997; Memon e Memon, 2002). A transmissão sexual da mulher para o homem parece ser menos eficiente do que a transmissão do homem para a mulher (Thomas et al., 1995; Herrine e Weinberg, 1999).

Outras vias de exposição percutânea ou de mucosa ao sangue e/ou secreções, de indivíduos com infecção pelo HCV, foram sugeridas na literatura, embora apresentem importância epidemiológica menos evidente do que as vias de transmissão por hemotransusão ou uso de drogas injetáveis, devido a sua baixa prevalência ou devido à presença de fatores de risco adicionais. Assim, foram descritas as seguintes: compartilhamento de escovas de dente, lâminas de barbear e alicates de cutículas não-esterilizados em indivíduos infectados com HCV e aqueles não-infectados; utilização de instrumentos ou equipamentos contaminados durante a realização de procedimentos como ritos religiosos, tatuagem, *piercing* ou acupuntura; e acidentes com agulhas ou lâminas contaminadas com HCV envolvendo profissionais da área de saúde (Heintges e Wands, 1997; Alter et al., 1998; Cheney e Graham, 2000; Memon e Memon, 2002; Lock et al., 2006; Giorlia e Zanetta, 2007; De et al., 2008).

Também foi descrito risco em ex-atletas de futebol, que entre as décadas de 50 e 80 compartilharam agulhas e seringas não-descartáveis e contaminadas com HCV, para aplicação de “energéticos” ou complexos vitamínicos injetáveis antes, durante e/ou após os treinamentos ou jogos oficiais (Silva et al., 2001; Souto et al., 2003).

Risco maior para a aquisição da infecção pelo HCV também pode ocorrer em indivíduos que vivem em situações socioeconômicas precárias, assim como aqueles confinados em instituições sociais, de saúde ou prisionais onde aglomerações, hábitos de higiene inadequados ou compartilhamento de objetos perfurocortantes contaminados pelo HCV contribuem para o contágio (Guimarães et al., 2001).

2.10 Manifestações clínicas e história natural da infecção pelo HCV

O conhecimento mais aprofundado sobre a história natural da infecção pelo HCV em seres humanos vem sendo dificultado por vários fatores, dentre os quais o pequeno número de estudos prospectivos de longa duração, caráter presumido do início da infecção em número significativo de casos e a presença de variáveis de confusão como etilismo e coinfeção pelo HIV (Liang et al., 2000; Seeff, 2002).

2.10.1 Infecção aguda

O período de incubação da hepatite C varia de 2 a 26 semanas, com média de 6 a 7 semanas. Geralmente, os indivíduos acometidos são assintomáticos, ou apresentam sintomas leves e inespecíficos, como mal estar, fadiga, náuseas, anorexia, perda ponderal e dor em quadrante abdominal superior direito (Irwing et al., 2008; Santantonio et al., 2008). Tais sintomas, quando presentes, não permitem estabelecer a distinção entre a hepatite C aguda e outros tipos de hepatites virais agudas como as causadas pelo HAV e HBV, aparecem logo após o pico sérico de aminotransferases (entre a 6^a e 12^a semanas) e têm duração de 2 a 12 semanas. Achados físicos anormais como hepatomegalia e esplenomegalia ocorrem em

pequeno percentual de pacientes. Icterícia pode ser observada em até 30% dos indivíduos sintomáticos (Hoofnagle, 1997; Alter et al., 1998; Cheney et al., 2000; Bonkovsky e Mehta, 2001; Craxì et al., 2008; Kamal, 2008; Maheshwari et al., 2008; Modi e Liang, 2008).

O período que se inicia após o contato com o HCV e antecede a detecção de anticorpos anti-HCV no sangue (soroconversão) é conhecido como janela imunológica (Cossart, 1999). Os anticorpos anti-HCV, em geral, podem ser detectados entre 12 e 26 semanas a partir do contágio, quando são empregados ensaios imunoenzimáticos de 3ª geração (Erensoy, 2001). Contudo, a pesquisa de anticorpos anti-HCV em receptores de órgãos transplantados, pacientes em hemodiálise e com infecção pelo vírus da imunodeficiência humana ou síndrome da imunodeficiência adquirida (*Human immunodeficiency virus/Acquired immunodeficiency syndrome* ou HIV/AIDS) pode gerar resultados falso-negativos durante esse período. Resultados falso-negativos também podem ocorrer em indivíduos que se encontram no período de janela imunológica ou em pacientes com crioglobulinemia (Boyer e Marcellin, 2000; Cheney et al., 2000; Kamal, 2008). Por outro lado, o HCV-RNA pode ser detectado no soro ou plasma a partir da 1ª semana após a exposição experimental ou transfusional ao HCV, constituindo-se na melhor ferramenta para diagnóstico precoce da infecção aguda (Houghton, 1996; Boyer e Marcellin, 2000).

A hepatite C aguda apresenta curso evolutivo variável: a) um número significativo de pacientes apresenta padrão característico de elevação flutuante dos níveis séricos de aminotransferases (Colombo, 1996; Alter et al., 1998; Cheney et al., 2000; Bonkovsky e Mehta, 2001); b) aproximadamente 15% dos indivíduos infectados evoluem naturalmente para cura; a resolução espontânea da infecção ocorre na maioria dos pacientes por volta do 3º ao 4º mês da infecção aguda, os demais permanecem com HCV-RNA circulante em níveis detectáveis por um período maior do que 6 meses, caracterizando a infecção crônica (Alter et al., 1998; Cheney et al., 2000; Kamal, 2007); c) raramente, a infecção pelo HCV foi associada a quadro de hepatite fulminante, porém formas graves de hepatite C aguda foram relatadas em receptores de órgãos transplantados, pacientes com doença hepática crônica subjacente ou coinfectados com HBV (Colombo, 1996; Farci et al., 1996;

Hoofnagle, 1997; Gish e Lau, 1997; Alter et al., 1998; Booth et al., 2001; Lauer e Walker, 2001; Heller e Rehermann, 2005).

2.10.2 Infecção crônica

A resposta imune humoral e celular contra o HCV, na maioria dos casos, não é capaz de promover a eliminação do HCV do organismo. Dessa forma, cerca de 85% dos indivíduos com hepatite C aguda evoluem para infecção crônica, que compreende um amplo espectro de alterações: a) um número significativo (30%) de indivíduos permanece por um período de vários anos sem qualquer evidência bioquímica de hepatite, embora a maioria desses indivíduos já tenha alterações histológicas compatíveis com hepatite crônica; b) outros apresentam níveis séricos persistente ou intermitentemente elevados de aminotransferases, na ausência de sintomas de hepatite, e, juntamente com os primeiros, constituem os casos considerados “portadores sadios do HCV”; c) porém, um grande número de indivíduos infectados desenvolverá, ao longo de vários anos, evidências clínica, laboratorial e/ou histológica que indicam a progressão da doença para estágios mais avançados de fibrose hepática, bem como para complicações da doença hepática crônica como cirrose hepática descompensada e carcinoma hepatocelular. Cerca de 20% a 30% dos pacientes com hepatite C crônica evoluem para cirrose hepática após intervalo de 10 a 30 anos (Figura 2.14) (Hoofnagle, 1997; Alter et al., 1998; Di Bisceglie, 1998; Liang et al., 2000; Chen e Morgan, 2006; Ascione et al., 2007). Uma vez estabelecida a infecção crônica, apenas raramente se observa o desaparecimento espontâneo e definitivo da viremia (Lauer e Walker, 2001).

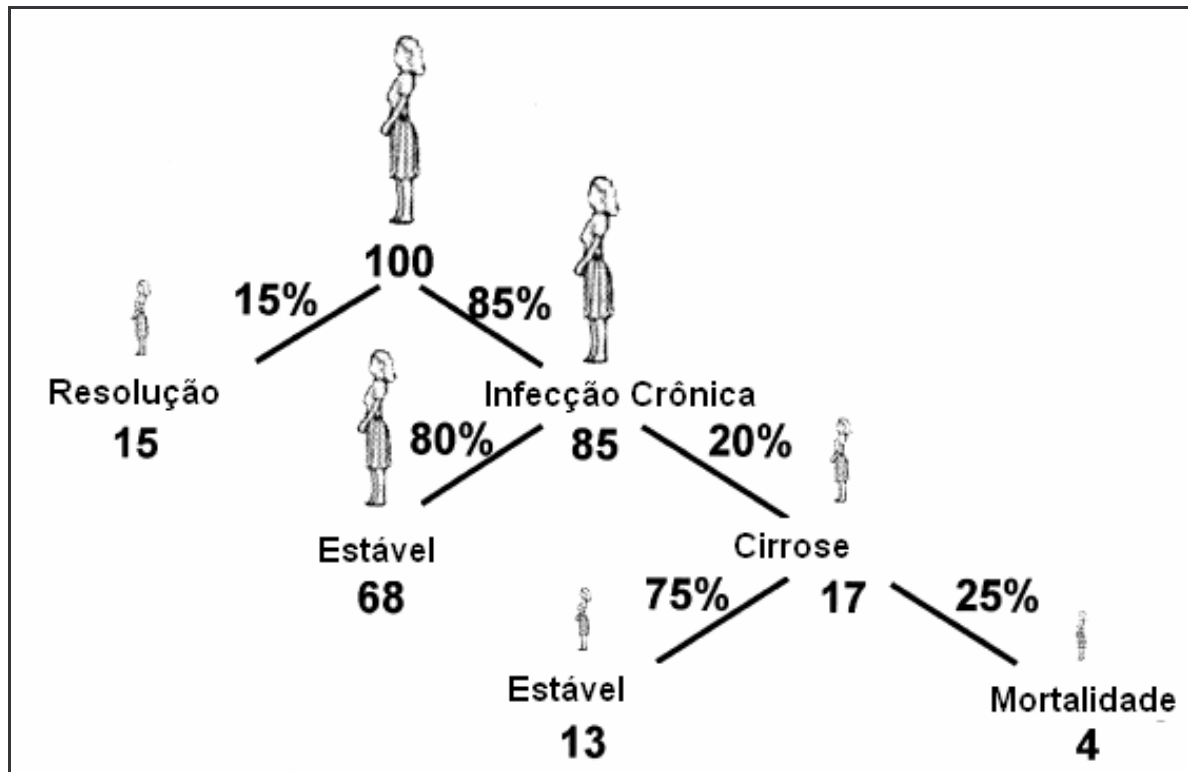


Figura 2.14. Representação esquemática da história natural da infecção pelo HCV. Fonte: Seeff LB (1999, p. 14S). (Figura adaptada para o português).

Assim, o quadro clínico da infecção crônica pelo HCV mostra-se bastante variável, compreendendo desde formas assintomáticas a quadros constituídos por sintomas leves e inespecíficos, dos quais a fadiga é o mais comum. Outros sintomas referidos pelos pacientes compreendem náusea, anorexia, perda ponderal, artralgia e desconforto no quadrante abdominal superior direito. No entanto, o quadro torna-se clinicamente mais exuberante quando da presença de manifestações extra-hepáticas e/ou complicações da doença hepática crônica (Di Bisceglie, 1998).

Embora o curso clínico da infecção crônica seja insidioso na maioria dos pacientes, fatores como consumo excessivo de álcool, imunossupressão, idade avançada durante o contágio, e coinfeção com HIV ou HBV foram identificados como fatores associados à progressão da hepatite C crônica para doença hepática crônica descompensada (Alter et al., 1998; Cheney et al., 2000; Bonkovsky e Mehta, 2001; Lauer e Walker, 2001; Poynard et al., 2003; Lo Re e Kostman, 2005; Thomson e Finch, 2005; Chen e Morgan, 2006; Ascione et al., 2007; Modi e Liang, 2008). Na

atualidade, a cirrose hepática descompensada associada ao HCV representa a principal indicação de transplante de fígado em vários países (Costa e Schiff, 1999).

Com base em estudos soropidemiológicos, demonstrou-se associação entre carcinoma hepatocelular e infecção pelo HCV. O intervalo entre infecção presumida e desenvolvimento do carcinoma hepatocelular está em torno de 30 anos. A ocorrência de carcinoma hepatocelular em pacientes com hepatite C crônica sem evidência de cirrose hepática é rara. Contudo, o risco estimado de desenvolvimento dessa neoplasia maligna nos pacientes com cirrose hepática já estabelecida parece aumentar de 1% a 4% ao ano (Lauer e Walker, 2001).

As causas mais comuns de óbito em pacientes com cirrose hepática são decorrentes de hemorragia digestiva causada por ruptura de varizes esofagianas e/ou gástricas, ou de carcinoma hepatocelular (Colombo, 1996).

Do ponto de vista da vigilância epidemiológica, todos os casos devem ser notificados e investigados para a correta adoção de medidas de controle. São considerados “casos suspeitos” todos os indivíduos que apresentam icterícia aguda e colúria, acompanhado ou não de níveis séricos de aminotransferases iguais ou maiores que três vezes o valor normal; história de exposição percutânea ou de mucosa a sangue e/ou secreções de pessoas portadoras ou com suspeita de infecção pelo HCV; exames sorológicos de triagem (anti-HCV) reagentes para hepatite C ou indivíduo que desenvolveu icterícia subitamente e evoluiu para óbito, sem outro diagnóstico confirmado. Os “casos confirmados” são constituídos por indivíduos que preenchem as condições de suspeitos, com detecção do anti-HCV e do HCV-RNA por método de biologia molecular, ou detecção do antígeno ou HCV-RNA em amostras de tecido, quando não for possível a coleta de soro ou plasma em casos que evoluíram para o óbito (MS, 2006).

2.10.3 Manifestações extra-hepáticas

O quadro clínico da infecção pelo HCV também compreende diversas alterações extra-hepáticas, dentre as quais as anormalidades imunológicas são freqüentemente detectadas no soro de pacientes com hepatite C crônica (Palekar e

Harrison, 2005). Crioglobulinas e fator reumatóide estão dentre as anormalidades imunológicas mais comumente detectadas (40 – 70%) (Vassilopoulos e Calabrese, 2005).

A prevalência das manifestações extra-hepáticas em pacientes com infecção crônica pelo HCV não é bem conhecida, porém sua frequência é maior naqueles em estágios mais avançados da infecção (Mayo, 2003). Entretanto, algumas manifestações extra-hepáticas podem aparecer como primeira evidência da infecção pelo HCV (Galossi et al, 2007). A frequência de trombocitopenia em pacientes com infecção crônica pelo HCV foi estimada em 17% a 41% (Nagamine et al., 1996; Caccoub et al., 2000).

Estudo transversal, de base hospitalar, monocêntrico, realizado na França, envolvendo 1614 pacientes com infecção crônica pelo HCV, revelou que 70% dos pacientes estudados apresentavam pelo menos uma manifestação clínica extra-hepática, sendo as mais frequentes: artralgia (23%), parestesia (17%), mialgia (15%), prurido (15%) e síndrome sicca – xerofthalmia ou xerostomia – (11%). Esse estudo também revelou como alterações imunológicas frequentes: crioglobulinas (40%), anticorpos antinucleares (10%), e anticorpos antimúsculo liso (7%). Os fatores associados à presença de manifestações extra-hepáticas e alterações imunológicas foram idade avançada, sexo feminino e fibrose hepática acentuada (Cacoub et al, 1999). A prevalência de alterações extra-hepáticas também foi determinada por outro estudo francês, com delineamento transversal, de base hospitalar, multicêntrico, envolvendo 321 pacientes com infecção crônica pelo HCV. Neste estudo, 38% dos pacientes estudados apresentaram pelo menos 1 manifestação extra-hepática, sendo as mais comuns: artralgia (19%), alterações cutâneas (17%), xerostomia (12%), xerofthalmia (10%) e neuropatia sensorial (9%). Além disso, as principais alterações imunológicas foram: crioglobulinas (56%), anticorpos antinucleares (41%), fator reumatóide (38%), anticorpos anticardiolipina (27%) e anticorpos antitireoglobulinas (13%) (Cacoub et al., 2000). Pawlotsky et al. (1994) realizaram estudo de caso-controle, prospectivo, envolvendo 61 pacientes com hepatite C crônica e relataram taxa de 41% de detecção de anticorpos contra diferentes componentes teciduais, como anticorpos antitireoglobulina, antitireoperoxidase, antimitocôndria, antimúsculo liso, antinucleares, dentre outros.

Em geral, tais anormalidades laboratoriais ocorrem com freqüência maior do que as síndromes clínicas resultantes da sua presença (Pyrsoopoulos e Reddy, 2001).

As manifestações extra-hepáticas são, em geral, autolimitadas quando presentes durante a infecção aguda. Contudo, as manifestações que ocorrem durante a infecção crônica freqüentemente são persistentes e podem alterar o curso evolutivo da infecção (Willson, 1997).

As manifestações extra-hepáticas parecem resultar da presença e/ou replicação viral nos sítios extra-hepáticos, bem como de mecanismos imunológicos (Hadziyannis, 1996; Dickson, 1997). Diversos grupos de pesquisadores obtiveram êxito em demonstrar a presença de seqüências genômicas do HCV pelas técnicas de RT-PCR ou de hibridização molecular, em sítios extra-hepáticos, particularmente nas células mononucleares do sangue periférico e nas células hematopoéticas de indivíduos infectados (Taliani et al., 1995; Lerat et al., 1998; Crovatto et al, 2000; Ramos-Casals e Font, 2005). Com relação aos principais mecanismos imunopatogênicos, pelo menos quatro foram sugeridos para explicar a presença de manifestações extra-hepáticas em pacientes com hepatite C crônica, mediadas por: a) imunocomplexos, como na crioglobulinemia mista; b) autoanticorpos ou ativação de linfócitos T específicos, como na tireoidite autoimune; c) processo linfoproliferativo monoclonal ou policlonal em determinados sítios, como na síndrome de Sjögren secundária; d) e efeitos indiretos de citocinas liberadas durante o processo inflamatório, como na tireoidite autoimune (Pawlotsky et al., 1995; Dickson, 1997).

São descritas duas características imunológicas relacionadas à infecção pelo HCV que predispõem ao desenvolvimento das alterações extra-hepáticas. Primeiro, a capacidade do vírus de escapar do sistema imune do hospedeiro, levando à infecção crônica, com acúmulo de imunocomplexos circulantes e a fenômenos autoimunes – aspectos associados com infecções virais crônicas. Segundo, o vírus é capaz de estimular a produção de fator reumatóide monoclonal, característica associada à crioglobulinemia tipo II ou crioglobulinemia associada ao HCV que constitui a principal alteração extra-hepática relacionada à infecção pelo HCV devido à morbidade e mortalidade que acompanham essa última (Agnello e De Rosa, 2004).

Em síndromes como a crioglobulinemia mista (tipo II), a associação patogenética com a infecção pelo HCV já está bem estabelecida. Em outras, como a trombocitopenia associada ao HCV, a associação é mais fraca, necessitando de estudos mais aprofundados para sua confirmação (Sène et al., 2004; Sterling e Bralow, 2006). Zignego et al. (2007) classificou as manifestações extra-hepáticas em categorias (A, B, C e D) de acordo com o grau de associação estabelecida entre alteração extra-hepática e infecção pelo HCV. Na primeira categoria (A), foram inseridas doenças cuja associação patogenética é mais forte como a crioglobulinemia mista; na categoria B, estão as manifestações que tem associação significativa com a infecção pelo HCV; na categoria C, foram alocadas doenças que requerem confirmação e caracterização pormenorizadas; e na categoria D, foram incluídas doenças com evidências epidemiológicas e patogenéticas ainda não fundamentadas (Quadro 2.1).

Quadro 2.1. Classificação das alterações extra-hepáticas associadas à infecção pelo vírus da hepatite C*

A: Associação definida com base na alta prevalência e patogênese:

- Crioglobulinemia mista (tipo II)

B: Associação definida com base na prevalência mais alta do que nos controles:

- Linfoma não-Hodgkin de células B
- Gamopatias monoclonais
- Porfíria cutânea tarda
- Líquen plano
- Trombocitopenia

C: Associação que necessita ser confirmada:

- Tireoidite autoimune
- Câncer de tireóide
- Síndrome sicca
- Fibrose pulmonar
- Diabetes mellitus
- Nefropatia não-crioglobulinêmica
- Aterosclerose aórtica

D: Observações não fundamentadas.

- Psoríase
- Neuropatia periférica/central
- Poliartrite crônica
- Artrite reumatóide
- Poliarterite nodosa
- Síndrome de Behçet
- Dermatopolimiosites
- Fibromialgia
- Urticária crônica
- Prurido crônico
- Pseudo-sarcoma de Kaposi
- Vitiligo
- Cardiomiopatias
- Úlcera corneana de Mooren
- Disfunção erétil
- Eritema acronecrolítico

* Fonte: Modificado de Zignego et al. (2007, p.3). (Quadro adaptado para o português).

Dentre as síndromes extra-hepáticas predominam as doenças de natureza não-neoplásica. Entretanto, prevalência mais alta de linfoma não-Hodgkin, principalmente de células B e de baixo grau de malignidade, foi relatada em pacientes com infecção pelo HCV e crioglobulinemia (Ferri et al., 1994; Pozzato et al., 1994; Silvestri et al., 1997). A infecção de células B e o estímulo crônico do sistema imune pelo HCV parecem desempenhar papel na fisiopatologia dos processos linfoproliferativos em pacientes com infecção pelo HCV, desde síndromes subclínicas como a crioglobulinemia mista até síndromes caracterizadas por proliferação maligna como linfoma não-Hodgkin (Ferri et al., 2007; Landau et al., 2007; Zignego et al., 2007a; 2007b).

Recentemente, foi identificada outra forma de infecção pelo HCV, denominada infecção oculta, que pode se apresentar em duas situações distintas principais: pacientes anti-HCV e HCV-RNA séricos negativos, com valores anormais de transaminases séricas; ou anti-HCV positivo e HCV-RNA negativo no soro, com valores normais de transaminases séricas. Nestes casos, a presença do HCV foi demonstrada no fígado, em locais extra-hepáticos como células mononucleares do sangue periférico ou ambos (Castillo et al., 2004; Carreño, 2006).

2.11 Achados histopatológicos hepáticos

Há evidências de que a doença hepática associada ao HCV possa ser mediada, pelo menos em parte, pela resposta imune do hospedeiro, embora um efeito citopático direto do HCV sobre os hepatócitos não possa ser descartado. Embora não sejam patognomônicas, as alterações histopatológicas hepáticas mais características da infecção pelo HCV são aquelas observadas na forma crônica da infecção (Gerber, 1995; Kumar et al., 2002).

Originalmente, De Groote et al. (1968) propuseram uma classificação simples para as hepatites crônicas, baseada fundamentalmente em critérios histológicos, tendo como critério principal a integridade da camada de hepatócitos situada na interface entre o lóbulo e o espaço-porta chamada placa limitante. Assim, as hepatites crônicas foram classificadas em dois tipos: hepatite crônica persistente,

onde a agressão à placa limitante mostrava-se ausente ou discreta, e hepatite crônica agressiva (ativa), caracterizada por maior grau de lesão da placa limitante. Posteriormente, outro tipo, chamado hepatite crônica lobular, foi adicionado à classificação das hepatites crônicas (Popper e Schaffner, 1971).

Knodell et al. (1981) propuseram um índice de atividade histológica para melhor avaliar, de forma semiquantitativa, a intensidade da atividade necroinflamatória, a partir de critérios como necrose periportal, necrose intralobular, inflamação portal e fibrose, em pacientes assintomáticos com hepatite crônica ativa. Esse sistema de escore, com algumas modificações, serviu de base para as classificações de hepatite crônica, posteriormente, adotadas (Desmet et al., 1994; Ishak et al., 1995; Bedossa e Poynard, 1996).

Como resultado de mais de duas décadas de investigação, diferentes agentes virais (HBV, HCV, dentre outros) e não-virais (medicamentos, autoimune) foram atribuídos à etiologia das hepatites crônicas, e um volume maior de informações com relação à história natural das hepatites virais foi obtido, tornando evidente a necessidade de reavaliação da classificação das hepatites virais crônicas. Foi sugerido que a nova classificação deveria não só abordar os principais componentes da atividade necroinflamatória e as alterações da arquitetura lobular como também a etiologia das hepatites crônicas (Schauer, 1991; Ludwig, 1993).

Um comitê da Associação Internacional para o Estudo do Fígado (*International Association for the Study of the Liver* ou IASL), formado por patologistas e hepatologistas experientes dos Estados Unidos e Europa, formulou nova proposta para classificação das hepatites crônicas, na qual foi dada ênfase à classificação etiológica das hepatites crônicas e à determinação das alterações histopatológicas. De acordo com a nova proposta, as hepatites crônicas foram classificadas como hepatite crônica B, hepatite crônica C, hepatite crônica D, hepatite autoimune e hepatite crônica causada por medicamentos; a intensidade da atividade necroinflamatória foi estratificada em quatro tipos – mínima, discreta, moderada e acentuada – e o estadiamento foi definido em diferentes escores (0 = ausência de fibrose, 1 = fibrose discreta, 2 = fibrose moderada, 3 = fibrose acentuada, e 4 = cirrose) (Desmet et al., 1994).

Reconhecendo a importância do grau de atividade necroinflamatória e do estágio de fibrose hepática na avaliação terapêutica e prognóstica, Ishak et al. (1995) formularam um índice numérico, a partir de modificações do índice de atividade histológica de Knodell et al. (1981), que permitiu avaliar melhor a gravidade e o estágio de progressão das hepatites crônicas, além de possibilitar uma melhor comparação entre os resultados obtidos a partir de diferentes protocolos terapêuticos. Assim, valores numéricos, variando de 0 a 4, foram atribuídos às alterações histológicas pertencentes a uma das três categorias do escore de atividade necroinflamatória: A = inflamação periportal ou perisseptal; C = necrose focal, inflamação focal e apoptose; D = inflamação portal. No entanto, valores variando de 0 a 6 foram atribuídos às alterações da categoria B (necrose confluyente) do escore de atividade necroinflamatória, e do estágio de fibrose (alterações da arquitetura, fibrose e cirrose hepática). Também sugeriram que outras alterações histológicas, como presença de folículos linfóides, esteatose e lesão de canalículos biliares, características da hepatopatia crônica associada ao HCV (embora não-diagnósticas), fossem apenas descritas separadamente desse sistema numérico. No entanto, recomendaram que, na prática diagnóstica de rotina, tais alterações histológicas fossem registradas por meio de laudo descritivo.

O Grupo de Estudo Cooperativo METAVIR utiliza outro sistema de escore para avaliar a atividade histológica tendo como critérios principais a necrose lobular focal, a inflamação portal, a inflamação periportal e a necrose em ponte, e também para determinar o grau de fibrose hepática onde F_0 = ausência de fibrose, F_1 = fibrose portal sem formação de septos, F_2 = fibrose portal com formação de raros septos, F_3 = fibrose portal com numerosos septos, e F_4 = cirrose. Com base nos critérios de inflamação periportal e necrose lobular, o grupo francês METAVIR estabeleceu um algoritmo para avaliação da atividade histológica, que resultou no seguinte sistema de escore: A_0 = ausência de atividade, A_1 = atividade discreta, A_2 = atividade moderada, e A_3 = atividade acentuada) (Bedossa e Poynard, 1996).

A proposta do Clube de Patologia Hepática da Sociedade Brasileira de Patologia (SBP), aprovada pela Sociedade Brasileira de Hepatologia, resultou na classificação histopatológica de consenso nacional das hepatites crônicas. Nesta, os critérios propostos para semiquantificação das alterações histológicas variaram em

uma escala de 0 a 4, tanto para o estadiamento (alterações estruturais) como para a avaliação da atividade necroinflamatória (infiltrado inflamatório portal/septal, atividade periportal/perisseptal e atividade parenquimatosa) (Gayotto et al., 2000).

No Brasil, por meio da Portaria nº 34 de 28 de setembro de 2007, o MS decidiu aprovar o protocolo clínico e as diretrizes terapêuticas para hepatite viral C, no qual achados de atividade necroinflamatória e presença de fibrose hepática foram descritos de acordo com as classificações propostas pelo grupo francês METAVIR ou pela SBP.

A biópsia hepática representa importante ferramenta na avaliação da doença hepática associada ao HCV. Pelo estudo histológico do fígado, informações relevantes a respeito da gradação da atividade necroinflamatória e do estágio de fibrose podem ser obtidos. Além disso, permite a detecção ou exclusão de outras causas de lesão hepatocelular. Esse procedimento cirúrgico constitui o método mais preciso para avaliar a possível redução das alterações histológicas após a terapia antiviral. Entretanto, sua natureza invasiva, seus custos elevados e os riscos à saúde decorrentes da realização da biópsia hepática fizeram com que este procedimento não fosse realizado rotineiramente no manejo clínico dos pacientes infectados pelo HCV (Rosemberg, 2001; Saadeh et al., 2001; Bain et al., 2004; Kleiner, 2005).

Conseqüentemente, diversos marcadores biológicos foram sugeridos como marcadores substitutos de fibrose hepática, particularmente discriminando estágios mais avançados, como a cirrose, de estágios iniciais. Tais marcadores parecem ser mais úteis na prática clínica quando envolvem decisões terapêuticas em pacientes com contra-indicação para ou que se recusam a fazer a biópsia hepática. Ono et al. (1999) avaliaram a correlação entre uma série de parâmetros básicos utilizados rotineiramente em laboratório de análises clínicas e o estágio de fibrose hepática em 435 pacientes com hepatite C crônica. Os autores identificaram níveis séricos de albumina, fosfatase alcalina e desidrogenase láctica, tempo de protrombina (TP) e contagem de plaquetas como marcadores significativamente associados ao estágio de fibrose hepática. Correlação negativa entre contagem de plaquetas e estágio de fibrose hepática foi observada no estudo de Karasu et al (2007), onde a redução progressiva da contagem de plaquetas foi assinalada na medida em que havia

progressão do estágio de fibrose hepática. A combinação de contagem de plaquetas inferior a $150.000/\text{mm}^3$ com a relação aspartato aminotransferase (*Aspartate aminotransferase* ou AST)/alanina aminotransferase (*Alanine aminotransferase* ou ALT) $\geq 1,0$ mostrou ser fator preditivo positivo do grau de fibrose hepática (F₃-F₄, METAVIR) em uma parcela dos pacientes com infecção crônica pelo HCV (Pohl et al., 2001). O índice definido pela relação AST x TP expresso em INR (*International normalized ratio*)/Contagem de plaquetas x 100 parece estar associado à cirrose hepática em pacientes com infecção crônica pelo HCV, e ficou conhecido como GUCI (*Göteborg University cirrhosis index*) (Westin et al., 2008).

Imbert-Bismut et al. (2001) estudaram prospectivamente 11 marcadores bioquímicos em 205 pacientes infectados pelo HCV e demonstraram o valor preditivo para diagnóstico de fibrose clinicamente significativa (F₂-F₄, METAVIR) a partir de um índice de fibrose caracterizado pela combinação de alguns dos seguintes marcadores: α_2 -globulina (α_2 -macroglobulina e haptoglobina), γ -glutamil-transpeptidase (γ -GT), γ -globulina, bilirrubina total e apolipoproteína A₁. Posteriormente, esses parâmetros constituíram o FIBROTEST (Thabut et al., 2003). A inclusão de parâmetros como sexo, idade no momento da exposição ao HCV, idade no momento da biópsia hepática e consumo de álcool ao índice formado pelos cinco marcadores não contribuiu para aumentar o valor preditivo para fibrose clinicamente significativa (F₂-F₄, METAVIR) (Myers et al., 2002). Forns et al. (2002) avaliaram prospectivamente o estágio de fibrose hepática em 351 pacientes com hepatite C crônica utilizando vários parâmetros e identificaram idade e marcadores laboratoriais (γ -GT, colesterol e contagem de plaquetas) como fatores independentes preditivos de fibrose discreta (F₀-F₁, METAVIR), com acurácia de 96%. O índice definido pela relação AST/Contagem de plaquetas (*AST to platelet ratio index* ou APRI) x 100 com valores acima de 1,5 e 2,0 também se mostrou eficiente em identificar pacientes com hepatite C crônica com fibrose significativa ($\geq F_3$, Ishak et al., 1995) e cirrose, respectivamente, com elevado grau de acurácia (Wai et al., 2003).

Os níveis de imunoglobulinas séricas, particularmente IgG, encontram-se elevados em pacientes com hepatite C crônica, inclusive em pacientes com doença hepática mínima ou discreta (González-Quintela et al., 2003). Outro estudo revelou

correlação positiva entre níveis séricos de IgG, IgA e estágios de fibrose hepática (Watt et al., 2004).

Outros marcadores não-invasivos apresentaram valor discriminador entre fibrose clinicamente significativa e fibrose ausente ou discreta, e foram validados em estudos apropriados: marcadores séricos da matriz extracelular (ácido hialurônico, α_2 -macroglobulina e inibidor tecidual da metaloproteinase-1; FIBROSpect IISM) (Patel et al., 2004; Christensen et al., 2006).

O número limitado de biópsias hepáticas realizadas em cada paciente ao longo do curso da infecção pelo HCV dificulta a determinação mais precisa, não apenas da progressão, mas também da redução induzida pelo tratamento, da fibrose hepática. Deuffic-Burban et al. (2002) aplicaram com sucesso um modelo matemático (Markov) para quantificar com precisão a progressão da fibrose hepática e avaliar o impacto da terapia antiviral com interferon alfa sobre essa progressão em pacientes com hepatite C crônica submetido à, pelo menos, duas biópsias hepáticas. Dentre pacientes com idade de 40 anos durante o contágio e com duração da infecção igual a 10 anos, foi possível prever por meio desse modelo que os pacientes virgens de terapia antiviral apresentavam risco maior (27,4% *versus* 4,2%) de progredir do estágio ausência de fibrose ou fibrose leve para o estágio fibrose acentuada ou cirrose (de acordo com o sistema METAVIR), em um período de cinco anos, quando comparados aos pacientes tratados.

Embora a necessidade de realização de biópsia hepática possa ser reduzida em até 70% dos pacientes quando são utilizados marcadores séricos não-invasivos, a biópsia hepática é considerada método padrão-ouro na avaliação do grau de fibrose hepática de pacientes em avaliação pré-terapêutica (Sebastiani et al., 2006). Contudo, o uso racional dos marcadores substitutos de fibrose hepática parece ter seu lugar na prática clínica (Leroy e Zarski, 2008; Sebastiani e Alberti, 2008).

2.12 Abordagem diagnóstica

Com base apenas nos aspectos clínicos da infecção não é possível identificar o agente etiológico da hepatite C, sendo necessária a realização de exames

complementares. Os exames laboratoriais inespecíficos incluem as dosagens séricas de aminotransferases – ALT (Transaminase glutâmicopirúvica ou TGP) e AST (Transaminase glutâmico oxalacética ou TGO) – que indicam lesão do parênquima hepático, e o nível de ALT pode estar três vezes ou mais acima dos valores de referência para normalidade. As bilirrubinas séricas podem estar elevadas e o TP pode estar alargado (TP > 17s ou INR > 1,5), indicando, geralmente, doença hepática mais grave. Na infecção crônica, o padrão ondulante dos níveis séricos de aminotransferases, especialmente a ALT, diferentemente da hepatite B, apresenta-se entre seus valores normais e valores mais altos.

Entretanto, a investigação laboratorial que permite o diagnóstico da infecção pelo HCV baseia-se na realização de testes imunossorológicos e moleculares (Herrine, 2002; Chevaliez e Pawlotsky, 2007). Os primeiros visam à detecção de anticorpos anti-HCV no soro ou plasma de pacientes infectados e, para tanto, vários ensaios imunoenzimáticos (EIE) já estão disponíveis na prática laboratorial. A detecção de anticorpos anti-HCV não permite a diferenciação entre infecção pregressa e atual, bem como entre infecção aguda e crônica, significando apenas contato prévio com o agente. Resultados falso-positivos, como em pacientes com hiperglobulinemia, e falso-negativos, como em pacientes hemodialisados ou com imunodeficiência, ocorrem menos freqüentemente quando são aplicados testes imunoenzimáticos de 3ª geração que utilizam uma mistura de antígenos virais (core, NS3, NS4 e/ou NS5) (Cossart, 1999), ou de 4ª geração para detecção simultânea de antígenos do HCV e anticorpos anti-HCV em amostras de soro ou plasma (Lambert, 2007). A detecção de anticorpos anti-HCV em amostras de sangue coletadas em papel de filtro (*Dried blood spots* ou DBS) revelou taxas de sensibilidade e especificidade de aproximadamente 100% quando comparadas com amostras pareadas de plasma. O uso de eluatos de DBS parece constituir uma alternativa confiável para detecção de anticorpos anti-HCV em estudos epidemiológicos, sendo particularmente atrativo para trabalhos de campo (Parker et al., 1997; McCarron et al., 1999; Judd et al., 2003; Croom et al., 2006).

Recomenda-se a confirmação de resultados positivos para pesquisa de anticorpos anti-HCV por ensaios imunoenzimáticos através da realização de imunoenaios como *Recombinant Immunoblot Assay* (RIBA) e *Line immunoassay*

(LIA), considerados testes suplementares e dotados de maior especificidade. Tais ensaios baseiam-se na reatividade dos anticorpos anti-HCV circulantes com peptídios sintéticos e proteínas recombinantes dispostas em tiras de náilon. Com o emprego de testes de 3ª geração pode-se identificar o tipo de anticorpo anti-HCV (anti-core, anti-E2, anti-NS3, anti-NS4 e anti-NS5) detectado por ensaios imunoenzimáticos (Cossart, 1999; Erensoy, 2001). Entretanto, resultado anti-HCV positivo obtido por esses imunoenaios não indica necessariamente infecção atual, já que indivíduos que se recuperaram da infecção, naturalmente ou após terapia, podem permanecer ainda anti-HCV positivos por período prolongado (Houghton, 1996).

A detecção do antígeno core do HCV (*Hepatitis C Virus Core Antigen* ou HCVcAg) pode ser realizada no soro pelo ensaio imunoenzimático qualitativo ou quantitativo. Seus níveis no sangue apresentam forte correlação com a carga viral, sendo considerado marcador indireto da replicação viral. Foi estabelecido que 1 picograma por ml (pg/mL) do antígeno core equivale a aproximadamente 8.000 UI/mL de HCV-RNA. O ensaio apresenta limite de sensibilidade de 1 a 2 pg/mL, porém sua sensibilidade diminui quando há evidência de baixa atividade replicativa do vírus, isto é, nos casos em que a carga viral varia de 10.000 a 20.000 UI/mL (Couroucé et al., 2000; Pawlotsky, 2003a).

O diagnóstico precoce da infecção pelo HCV pode ser feito pela detecção combinada de antígeno (core) do HCV e anticorpos anti-HCV (anti-core, anti-NS3) em amostras de soro ou plasma. Os testes que empregam essa metodologia (ensaio imunoenzimático) já estão disponíveis comercialmente e são dotados de alta sensibilidade e especificidade. Além disso, foi possível obter significativa redução do período de janela imunológica, inferior apenas quando comparados à metodologia baseada em NAT, em pacientes com infecção aguda pelo HCV e que apresentam sorologia negativa para o marcador anti-HCV (Lambert, 2007; Tuke et al., 2008).

O diagnóstico molecular depende da detecção do RNA viral no soro, plasma ou tecido, o que pode ser demonstrado a partir de 1 semana do contato com o HCV, e constitui teste padrão-ouro para caracterização de infecção ativa. Para detecção qualitativa e quantitativa (carga viral) do HCV, torna-se necessária a etapa de amplificação do seu genoma devido à presença do HCV em pequenas quantidades

nos fluidos corporais. Tal amplificação é baseada em dois métodos principais: o primeiro consiste na amplificação do alvo, pela reação em cadeia da polimerase (RT-PCR) após síntese de DNA complementar fita dupla por transcrição reversa do RNA viral, ou pela amplificação mediada pela transcrição (*Transcription-mediated amplification* ou TMA), e o segundo na amplificação do sinal de luminescência, como na técnica de DNA ramificado (Pawlotsky, 2003b; Chevaliez e Pawlotsky, 2006). A técnica RT-PCR é muito utilizada em rotina laboratorial para a detecção de viremia – evidência direta de replicação viral –, já que oferece análise altamente específica, rápida e de fácil automação, apesar do seu custo mais elevado e quase que impraticável em muitas regiões do País. Testes de RT-*nested* PCR “*in house*” foram empregados em laboratórios de pesquisa em associação à rede pública. A técnica da PCR também permite a quantificação da carga viral – um dos parâmetros com valor preditivo para resposta à terapia antiviral (Erensoy, 2001; Scott e Gretch, 2007). Teste negativo para a detecção do RNA viral no soro ou plasma não exclui a eventual presença de baixa viremia e/ou persistência do vírus em baixa atividade replicativa nos sítios de replicação (Cossart, 1999). Na TMA, os produtos finais da reação ou amplicons são constituídos de fitas simples de RNA. Embora, em geral, seja menos sensível que a análise pela TMA (sensibilidade de 10 UI/mL), a técnica RT-PCR vem sendo mais utilizada na prática laboratorial, principalmente devido ao seu menor custo (Pawlotsky, 2002a).

Dentre os principais métodos utilizados na determinação dos genótipos do HCV, destacam-se:

a) Seqüenciamento nucleotídico de parte do genoma do HCV, seguido de análise filogenética, constitui padrão-ouro para a genotipagem do HCV (Forns e Costa, 2006). A análise por seqüenciamento direto a partir dos produtos da PCR ou após clonagem destes produtos é realizada mais freqüentemente a partir das regiões 5'NC, core, E1 e NS5B (Okamoto et al., 1992; Germer et al., 1999; Ross et al., 2000; Ansaldi et al., 2001; Halfon et al., 2001). A genotipagem pela análise das seqüências da região NS5 apresenta boa correlação com a análise a partir da região 5'NC, com a vantagem de permitir a determinação dos subtipos, dado que possui importância em epidemiologia molecular. Embora seja bem conservada, a região 5'NC apresenta diferenças nucleotídicas suficientes para permitir a distinção entre os seis genótipos

- principais do HCV, estratégia comumente adotada na prática clínica e que fornece informação adequada para atender a propósitos clínicos (Laperche et al., 2005);
- b) RT-PCR utilizando-se *primers* genótipo-específicos, freqüentemente dirigidos para a região core do genoma do HCV (Okamoto et al., 1992; Widell et al., 1994; Ohno et al., 1997);
- c) Análise do polimorfismo do tamanho dos fragmentos de restrição (*Restriction fragment length polymorphism* ou RFLP). A técnica RT-PCR/RFLP é bastante empregada em estudos epidemiológicos da infecção pelo HCV, permitindo a identificação precisa dos principais genótipos virais (Nakao et al., 1991; Davidson et al., 1995; Buoro et al., 1999);
- d) Hibridização reversa com sondas de oligonucleotídios ligadas à membrana de nitrocelulose e específicas para a região 5'NC, capaz de identificar os principais genótipos do HCV (*Line probe assay* ou LiPA). Moléculas de DNA biotinilado geradas por amplificação da região 5'NC pela RT-PCR são hibridizadas com sondas imobilizadas. Após a etapa de hibridização, moléculas de DNA não hibridizadas são removidas por lavagem, e a adição de um conjugado (estreptavidina marcada com fosfatase alcalina) permite sua ligação aos híbridos biotinilados. A adição de substrato cromógeno permite a formação de precipitado ao reagir com o conjugado, resultando em padrão característico de bandas para os diferentes genótipos. O primeiro ensaio para genotipagem do HCV foi representado pela versão protótipo do LiPA, que permitiu a identificação dos genótipos 1 a 4, incluindo os subtipos 1b, 2a e 2b (Stuyver et al., 1993). O desenvolvimento de ensaios de 2ª geração com sondas para a região 5'NC permitiu a identificação dos genótipos 1 a 6, incluindo maior número de subtipos (1a, 1b, 2a, 2b, 2c, 5a e 6a), sendo também disponibilizada comercialmente para uso diagnóstico na rotina laboratorial (Stuyver et al., 1996). Recentemente, maior eficiência na capacidade de discriminação dos genótipos 1 a 6 e seus principais subtipos do HCV foi obtida a partir de nova versão do LiPA baseada na hibridização reversa simultânea para regiões 5'NC e core (Bouchardeau et al., 2007);
- e) Sorotipagem – método baseado em ensaios imunoenzimáticos que visam à detecção de anticorpos séricos genótipo-específicos contra epítomos do core ou NS4 (Mondelli et al., 1994; Bhattacharjee et al., 1995; Pawlotsky et al., 1997; Sandres et

al., 2001). A sorotipagem do HCV possibilita a determinação do genótipo do HCV pela detecção de anticorpos tipo-específicos ou “sorotipos” e apresenta sensibilidade em torno de 90% em pacientes imunocompetentes. Porém, esse percentual torna-se menor em pacientes imunodeprimidos ou naqueles em HD. A sorotipagem permite identificar os seis genótipos principais, entretanto, apresenta como limitações a impossibilidade de caracterização de alguns subtipos e a distinção entre reatividade cruzada e infecções mistas, além de ser dotada de menor sensibilidade e especificidade quando comparada às técnicas anteriores (Pawlotsky, 2002b).

Dentre os métodos de genotipagem acima citados, o seqüenciamento nucleotídico seguido da análise filogenética constitui-se no método padrão-ouro para a determinação dos diferentes genótipos do HCV (Erensoy, 2001).

Solmone et al. (2002) demonstraram que o uso de eluatos de DBS também mostrou ser método simples e confiável para detecção qualitativa e genotipagem do HCV, com taxas de sensibilidade acima de 99% e especificidade acima de 95%, devendo ser particularmente útil em trabalhos de campo, onde existam dificuldades de coleta, processamento, armazenamento e transporte de amostras de sangue sob temperaturas controladas.

2.13 Abordagem terapêutica

2.13.1 Hepatite C

Atualmente, o tratamento da hepatite C crônica segue as recomendações de consenso estabelecidas pelo NIH, EUA (2002) e o Consenso Internacional de Paris, França (2002). No Brasil, com base nessas recomendações e após consulta ao Comitê Técnico Assessor do PNHV, o MS decidiu aprovar, por meio da Portaria nº 34 de 28 de setembro de 2007, protocolo clínico e diretrizes terapêuticas para a hepatite viral crônica C. Esse protocolo é de caráter nacional, devendo ser seguido pelas Secretarias de Saúde dos Municípios, dos Estados e do Distrito Federal. Como critérios gerais de inclusão foram adotados os seguintes:

- a) Ser portador do HCV por teste de biologia molecular (teste qualitativo);

- b) Ter realizado, nos últimos 24 meses, biópsia hepática onde foram evidenciadas atividade necroinflamatória de moderada a intensa e presença de fibrose de moderada a intensa de acordo com as classificações METAVIR ou da SBP;
- c) Ter entre 12 e 70 anos de idade.

Deverão ser excluídos do protocolo terapêutico (tanto com interferon convencional como com interferon peguilado) todos os pacientes que apresentem um ou mais das seguintes características:

- a) Tratamento prévio com interferon peguilado (associado ou não à ribavirina);
- b) Consumo abusivo de álcool nos últimos seis meses;
- c) Hepatopatia descompensada;
- d) Cardiopatia grave;
- e) Doença da tireóide descompensada;
- f) Neoplasias;
- g) Diabetes mellitus tipo 1 de difícil controle ou descompensada;
- h) Convulsões não-controladas;
- i) Imunodeficiências primárias;
- j) Homens e mulheres sem adequado controle contraceptivo;
- k) Gravidez (beta-HCG positivo); e
- l) Não concordância com o termo de responsabilidade.

Na avaliação inicial dos pacientes com hepatite C, candidatos ao tratamento antiviral, devem constar anamnese completa, exame físico e exames laboratoriais que incluem: hemograma completo com contagem de plaquetas e tempo de protrombina; bioquímica sérica; hormônio estimulante da tireóide; anti-HIV 1/2; HBsAg; beta-HCG (para mulheres em idade fértil que usarão ribavirina); biópsia hepática e exame anatomopatológico realizado nos últimos 24 meses (salvo para hemofílicos e cirróticos compensados). Para pacientes infectados com o genótipo 1, deve-se realizar também detecção quantitativa do ácido ribonucléico viral por tecnologia biomolecular (carga viral).

Todos os pacientes devem ser monitorados clínica e laboratorialmente durante o tratamento antiviral. Pacientes infectados com o genótipo 1 do HCV serão candidatos ao tratamento com a combinação interferon peguilado alfa-2a ou alfa-2b e ribavirina desde que apresentem contagens de plaquetas superior a $75.000/\text{mm}^3$ e de neutrófilos superior a $1.500/\text{mm}^3$ em exames antes do início do tratamento. Nos pacientes infectados com o genótipo 1 que estiverem em uso de interferon peguilado associado ou não à ribavirina, deverá ser realizado exame de detecção quantitativa do ácido ribonucléico viral na 12^a semana de tratamento para avaliar resposta virológica precoce. Aqueles pacientes que ainda apresentam HCV-RNA detectado (teste quantitativo) ou que não tenham obtido uma redução de pelo menos 2 logs (100 x) no valor da carga viral (em UI/mL) em relação à carga viral pré-tratamento deverão interromper o tratamento. Ao passo que os pacientes com HCV-RNA não-detectado (teste quantitativo) ou que tenham obtido redução igual ou superior a 2 logs no valor da carga viral em relação à carga viral pré-tratamento deverão manter o tratamento até a 48^a semana quando deverá ser realizado o teste qualitativo para avaliação da resposta virológica ao final do tratamento. Caso o exame realizado na 48^a semana mostre a eliminação do HCV, o exame será repetido após 24 semanas para avaliação da resposta virológica sustentada (RVS).

O tratamento preconizado para pacientes infectados com os genótipos 2 ou 3 do HCV é feito com a combinação interferon convencional alfa-2a ou alfa-2b e ribavirina até completar 24 semanas, porém devem apresentar contagens de plaquetas superior a $50.000/\text{mm}^3$ e de neutrófilos superior a $1.500/\text{mm}^3$ em exames antes do início do tratamento. Ao final da 24^a semana, deve ser realizado exame de detecção qualitativa do ácido ribonucléico viral para avaliação da resposta virológica ao final do tratamento. Caso esse exame indique resultado não-detectado, o exame será repetido após 24 semanas para avaliação da RVS.

A Portaria nº 34 de 28 de setembro de 2007 também contempla o tratamento de pacientes infectados com genótipos raros (4 e 5) no Brasil, bem como o retratamento de pacientes não-respondedores ou recidivantes tratados originalmente com interferon convencional associado ou não à ribavirina.

De acordo com a resposta virológica, os pacientes são classificados em:

- a) Não-Respondedores: Pacientes com HCV-RNA detectado (teste quantitativo) ou com redução inferior a 2 logs no valor da carga viral na 12^a semana de tratamento em relação à carga viral pré-tratamento (para aqueles com genótipo 1), ou HCV-RNA detectado (teste qualitativo) ao final do tratamento;
- b) Recidivantes: Pacientes com HCV-RNA detectado 24 semanas após o final do tratamento, após ter apresentado HCV-RNA não-detectado (teste qualitativo) ao final do tratamento;
- c) Respondedores (RVS): Pacientes com ausência de HCV-RNA detectado no soro pelo teste qualitativo com limite mínimo de detecção de 50 UI/mL 24 semanas após o final do tratamento.

A RVS é o melhor indicador de eficácia terapêutica na hepatite C crônica. As taxas de RVS variam de acordo com o genótipo infectante: pacientes infectados com o genótipo 1 quando tratados com a associação interferon peguilado e ribavirina apresentam taxas de RVS variando entre 42 – 46%; aqueles infectados com os genótipos 2 ou 3 apresentaram as maiores taxas (76 – 82%) (NIH, 2002; Strader et al., 2004).

A interrupção do tratamento antiviral (tanto com interferon convencional como com interferon peguilado, associado ou não à ribavirina) está associada não apenas à ausência de resposta virológica, mas também ao desenvolvimento de intolerância aos medicamentos e/ou vários efeitos adversos. Dentre os principais efeitos adversos, destacam-se sintomas constitucionais como fadiga, cefaléia, febre, mialgia e artralgia; alterações hematológicas como anemia, leucopenia e trombocitopenia; sintomas neuropsiquiátricos como alterações cognitivas e do humor; alterações tireoidianas, dentre outras (Russo e Fried, 2003).

Os principais fatores definidos como preditivos de boa resposta ao tratamento antiviral foram: sexo feminino, idade inferior a 40 anos, infecção pelos genótipos 2 ou 3, fibrose hepática ausente ou discreta e baixa carga viral (<800.000 UI/mL). Além disso, resposta virológica precoce (definida como redução de pelo menos 2 logs na carga viral determinada durante a 12^a semana de tratamento em relação à carga viral pré-tratamento) e aderência plena ao tratamento antiviral (definida como a tomada de mais de 80% da dose dos medicamentos antivirais por período maior

que 80% da duração completa do tratamento) também constituem fatores preditivos de RVS. Independentemente da obtenção ou não de resposta virológica, como desfechos esperados com o tratamento antiviral, estão a melhora da função hepática, a diminuição da evolução para doença hepática terminal e a redução da probabilidade de evolução para o transplante hepático (Ferrenci, 2004; Hughes e Shafran, 2006).

2.14 Trombocitopenia

2.14.1 Considerações sobre megacariocitopoese e trombocitopoese

As plaquetas ou trombócitos são formadas a partir da fragmentação citoplasmática de células chamadas megacariócitos – encontradas em pequeno percentual (0,02% a 0,05% das células nucleadas) na medula óssea (Stenberg e Hill, 1999). O processo que leva à produção de plaquetas ocorre em duas etapas seqüenciais: a primeira, designada megacariopoese ou megacariocitopoese, tem início em células progenitoras da medula óssea que, por ação de fatores de crescimento hematopoético, tornam-se comprometidas com a linhagem megacariocítica (Unidades formadoras de colônias de megacariócitos ou UFC-Meg), entram em processo de endomitose (duplicação do DNA não acompanhada de divisão nuclear ou citoplasmática) e diferenciação, até alcançar o estágio de maturação correspondente aos megacariócitos; a segunda, denominada trombopoese ou trombocitopoese, refere-se à formação e à liberação de plaquetas a partir de prolongamentos citoplasmáticos (pró-plaquetas) dos megacariócitos (Figura 2.15) (Li e Kuter, 2001; Schulze e Shivdasani, 2005; Geddis e Kaushansky, 2007; Kaushansky, 2008).

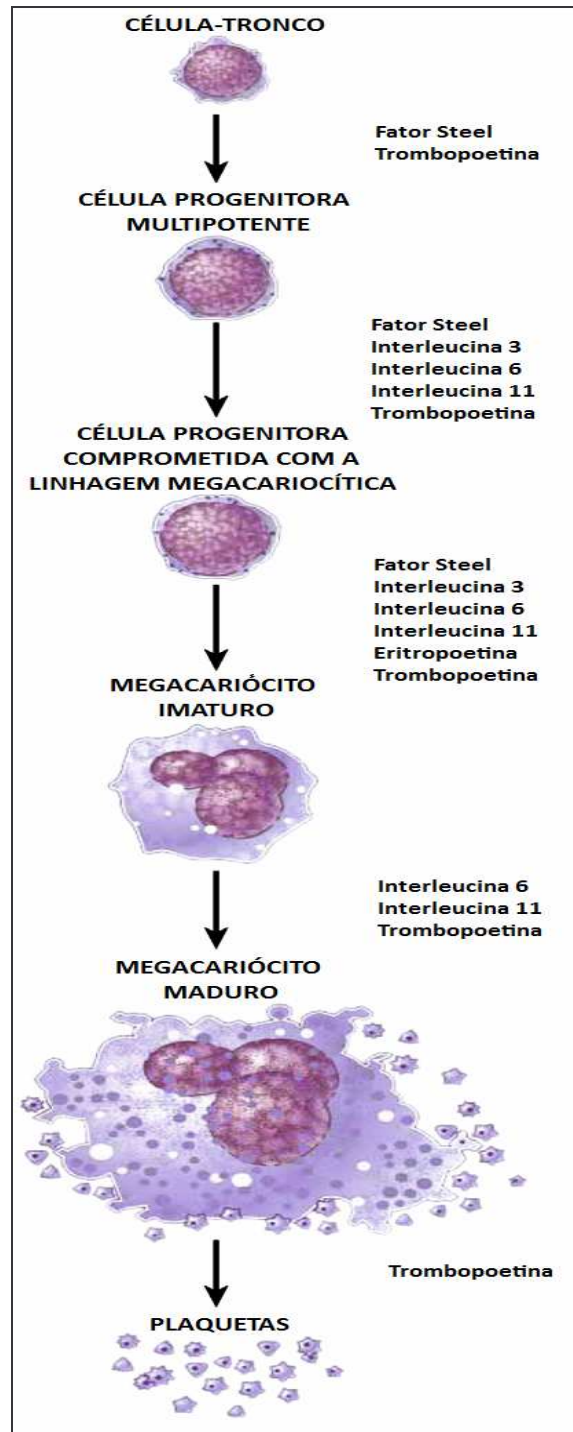


Figura 2.15. Representação esquemática das principais etapas da megacariopoese e trombopoese, e do papel de fatores de crescimento hematopoético, incluindo a trombopoetina, nessas etapas. Fonte: Kaushansky K (1998, p. 748). (Figura adaptada para o português).

Os megacariócitos maduros mostram-se capazes de atravessar a parede dos sinusóides medulares, tornando-se células circulantes. Entretanto, mais freqüentemente, essas células expandem seus prolongamentos citoplasmáticos para dentro dos sinusóides medulares, onde se fragmentam dando origem às plaquetas. Após a liberação das plaquetas na corrente sangüínea, os megacariócitos medulares permanecem envoltos por pequena quantidade de citoplasma, sendo chamados megacariócitos senescentes ou desnudos, os quais entram em apoptose e são finalmente fagocitados por macrófagos (Figura 2.16) (Kuter, 2001). Recentemente, De Botton et al. (2002) demonstraram que a ativação de proteases da família das caspases (caspases 3 e 9) nos megacariócitos exerce papel fundamental no processo de plaquetogênese. Com relação à caspase 3, a formação de pró-plaquetas parece estar relacionada à sua ativação em determinados compartimentos celulares (ativação localizada), ao passo que a indução de apoptose nos megacariócitos parece estar associada à sua ativação em todo o citossol (ativação difusa).

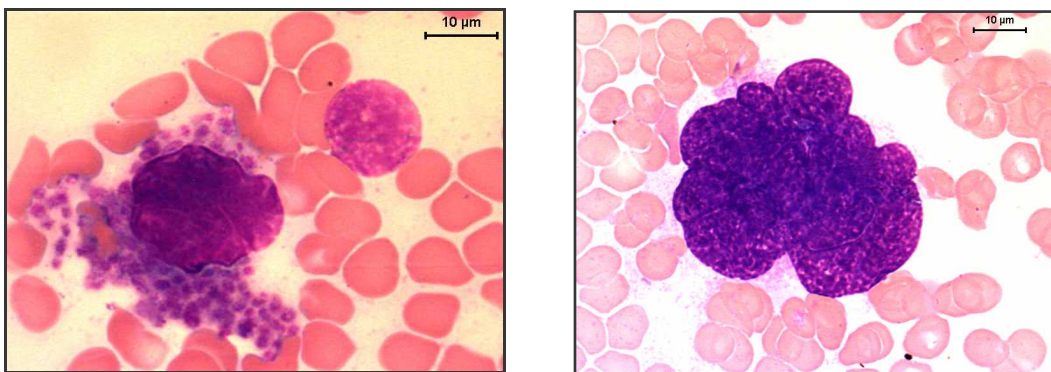


Figura 2.16. Estágios de maturação de megacariócitos. Megacariócito maduro (à esquerda) e megacariócito senescente ou desnudo (à direita) em esfregaço de medula óssea de paciente com trombocitopenia associada ao vírus da hepatite C. A barra de escala representa 10 µm. (Coloração May-Grünwald-Giemsa, 1.000x). Elaborado pelo autor (De Almeida AJ, 2004).

À microscopia óptica, estágios distintos de maturação dos megacariócitos podem ser caracterizados com base em critérios morfológicos como: relação núcleo-citoplasmática, forma nuclear, basofilia e granularidade. Os megacariócitos maduros

são células de fácil identificação já que são células grandes (de 50 μm – 60 μm de diâmetro), com pequena relação núcleo-citoplasmática e, devido ao processo de endomitose, poliplóides (em média 16 N); o núcleo é único, porém irregular e polilobulado, e com cromatina densa; o citoplasma é volumoso, rico em grânulos e, com freqüência, circundado por plaquetas em processo de formação (plaquetogênese). Por outro lado, os megacariócitos imaturos são células de dimensões inferiores (de 20 μm – 25 μm de diâmetro), diplóides e com alta relação núcleo-citoplasmática; o núcleo é unilobulado e o citoplasma escasso, basofílico, hipogranular e, freqüentemente, não-plaquetogênico (Kuter, 2001). Os megacariócitos maduros constituem a maioria dentro da população de megacariócitos na medula óssea (Stenberg e Hill, 1999).

Do ponto de vista ultra-estrutural, podem ser encontradas no citoplasma dos megacariócitos e, em menor extensão, das plaquetas, organelas envolvidas com a biossíntese de proteínas como ribossomos, retículo endoplasmático, complexo de Golgi e mitocôndrias. Além disso, outros componentes que participam de atividades metabólicas distintas podem ser encontrados no interior dessas células como componentes do citoesqueleto (microtúbulos e microfilamentos), lisossomos, microperoxissomos, grânulos de armazenamento e complexo sistema de membranas de demarcação resultantes de invaginações da membrana plasmática e que parece funcionar como reservatório de membranas para formação de proplaquetas (George, 2000; Italiano e Hartwig, 2005; White e Krumwiede, 2007). A maioria das proteínas e grânulos presentes nas plaquetas é produzida nos megacariócitos. A superfície das plaquetas apresenta grande número de denteações ou chanfraduras resultantes da organização do sistema de membranas de demarcação. O diâmetro médio das plaquetas pode variar entre diferentes indivíduos, com valores oscilando entre 1,5 μm – 3,0 μm , o que corresponde a aproximadamente 1/3 – 1/4 do diâmetro dos glóbulos vermelhos (Parise et al., 2001).

As plaquetas constituem pequenos fragmentos citoplasmáticos envoltos por unidade de membrana plasmática e apresentam a capacidade de aderir aos locais de lesão vascular, agregar com outras plaquetas e facilitar a formação da trombina, contribuindo assim para a hemostasia. Para tanto, as plaquetas apresentam uma

variedade de receptores específicos em sua superfície, dos quais vários ocorrem em forma de complexos funcionais como as glicoproteínas (GP) plaquetárias GP IIb/IIIa, GP Ia/IIa e GP Ib/IX. Além disso, a presença de epítomos ao longo das moléculas de GP contribui para o papel imunogênico das plaquetas (George, 2000; Kuter, 2001; Kunicki e Nugent, 2005).

Vários fatores de crescimento hematopoético (interleucina [IL] 3, IL-6, IL-11, dentre outros) apresentam atividade megacariopoética comprovada, sendo o mais importante é a trombopoetina – uma glicoproteína composta de 332 aminoácidos, de aproximadamente 95 kDa, e sintetizada principalmente no fígado (Figura 2.17). A molécula da trombopoetina apresenta dois domínios: domínio (aminoácidos 1 – 153) para a ligação ao receptor c-Mpl (*cellular-myeloproliferative leukemia*) – expresso, principalmente, em células progenitoras da linhagem megacariocítica, megacariócitos e plaquetas, com expressão progressivamente menor da forma não-funcional do receptor na medida em que ocorre o processo de maturação dos megacariócitos –, e domínio C-terminal (aminoácidos 154-332) altamente glicosilado e que mantém a estabilidade da molécula (Kaushansky, 2006; Kuter, 2007; Kaushansky, 2008). Embora a trombopoetina seja sintetizada de forma constitutiva, os níveis circulantes de trombopoetina aumentam em resposta à redução da quantidade de plaquetas no sangue. Dessa forma, em resposta à necessidade aumentada de liberação de plaquetas, os megacariócitos aumentam em número, tamanho e grau de ploidia (Kato et al., 1998; Kuter, 2001; Kuter e Begley, 2002).

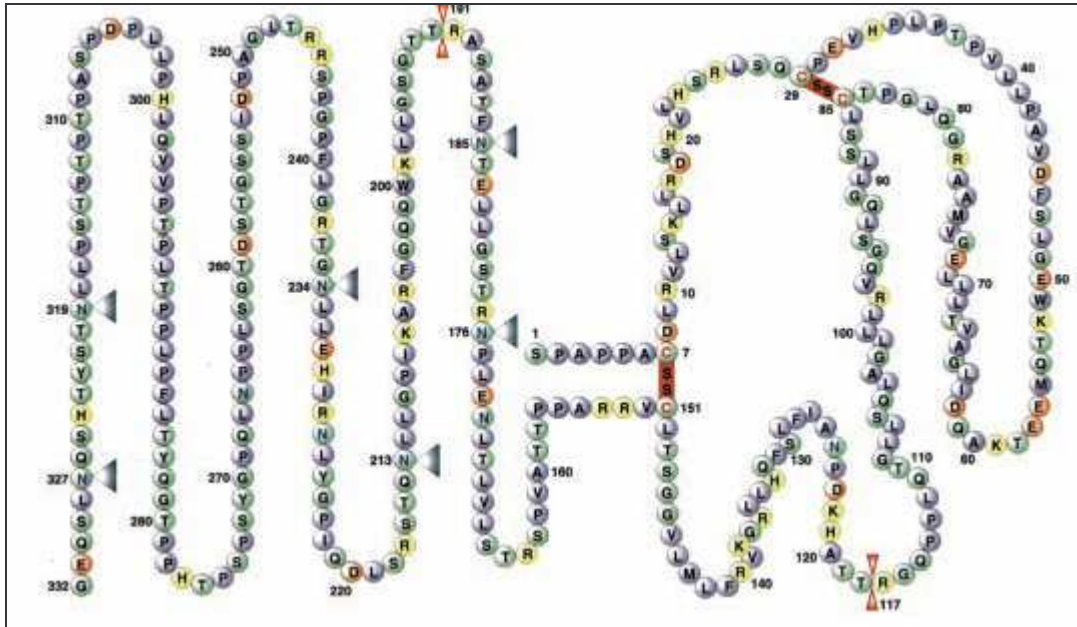


Figura 2.17. Representação esquemática do modelo estrutural da trombopoetina humana, com dois domínios nas regiões N-terminal (NH₂) – aminoácidos 1-153, e C-terminal (COOH) – aminoácidos 154-332. Aminoácidos são apresentados como unidades circulares designados por letra única em seu interior. Fonte: Kato T et al (1998, p. 324). (Figura adaptada para o português).

As plaquetas apresentam sobrevida na circulação sangüínea variando de 8 a 12 dias, com média de 10 dias, a maioria sendo removida após este período pelas células do sistema mononuclear fagocitário, principalmente do baço, fígado e medula óssea; porém, uma fração delas é consumida no processo de hemostasia (Stenberg e Hill, 1999; Lourenço, 2004). Em condições nas quais se presume que o mecanismo da trombocitopenia esteja relacionado à destruição acelerada das plaquetas – como em diversas infecções virais, doenças do colágeno, doenças linfoproliferativas e púrpura trombocitopênica idiopática –, pode-se observar não apenas parada ou bloqueio de maturação dos megacariócitos, caracterizada pelo predomínio de megacariócitos imaturos na medula óssea, como também a presença de megacariócitos considerados não-formadores de plaquetas ou não-plaquetogênicos, caracterizados por apresentar citoplasma menos granular, altamente basofílico, de contornos regulares e sem evidência de plaquetas em processo de formação na sua periferia, apesar do seu estágio de maturação mais tardio. Entretanto, devido provavelmente à hiperplasia megacariocítica induzida pela

trombopoetina nessas condições, a presença de tais anormalidades morfológicas é acompanhada freqüentemente de produção normal ou mesmo aumentada de plaquetas (Stenberg e Hill, 1999).

Duas importantes vias de sinalização intracelular podem ser moduladas pela trombopoetina por meio de sua ligação ao receptor c-Mpl: Jak/Stat (*Janus tyrosine kinase/Signal transducers and activators of transcription*) e MAPK (*Mitogen-activated protein kinase*), resultando em ações biológicas já conhecidas da trombopoetina, como o estímulo ao crescimento de UFC-Meg e a indução da maturação dos megacariócitos, contribuindo assim para aumentar não apenas o número, mas também as dimensões e o grau de ploidia dos megacariócitos, respectivamente. Além disso, regula positivamente a expressão de marcadores de superfície específicos da linhagem megacariocítica-plaquetária, como os complexos glicoprotéicos IIb/IIIa e Ib/IX. Contudo, a trombopoetina apresenta efeito muito discreto sobre a liberação de plaquetas a partir dos megacariócitos mais maduros, devido provavelmente à regulação negativa da expressão do receptor c-Mpl nessas células (Ritchie et al., 1999; Ward et al., 2000; Li e Kuter, 2001; Matsumura e Kanakura, 2002).

2.14.2 Investigação da trombocitopenia

Durante a avaliação de pacientes com trombocitopenia – definida como a contagem de plaquetas inferior a $150.000/\text{mm}^3$ –, particularmente naqueles assintomáticos, torna-se fundamental excluir, a princípio, a hipótese de pseudotrombocitopenia, uma anormalidade rara (0,09% a 0,21%) detectada após contagem automatizada de plaquetas e causada mais comumente pela agregação plaquetária *in vitro* em amostras de sangue total coletadas em tubos contendo ácido etilendiaminotetracético (*Ethylendiaminetetraacetate* ou EDTA) como anticoagulante (George e Rizvi, 2001).

Uma vez confirmada a trombocitopenia, duas considerações a respeito da avaliação sistemática do paciente tornam-se importantes: identificação da causa da trombocitopenia e determinação da ausência ou presença de manifestações

hemorrágicas, as duas com valor terapêutico e prognóstico. Para tanto, anamnese e exame físico minuciosos, além da realização de exames laboratoriais tornam-se necessários (Warkentin e Kelton, 1995).

A partir de estudos de cinética plaquetária foram determinados três mecanismos fisiopatológicos principais envolvidos no desenvolvimento de trombocitopenia: diminuição da produção de plaquetas, destruição plaquetária acelerada e hiper-seqüestração esplênica. Em uma boa proporção dos pacientes trombocitopênicos, mais de um mecanismo pode estar presente, simultânea ou seqüencialmente (Levine, 1999). Assim, na prática hematológica rotineira, a análise semiológica da lâmina de sangue periférico, o exame de medula óssea obtida pela punção aspirativa e/ou punção-biópsia e a avaliação das dimensões esplênicas fornecem informações de grande relevância para abordagem etiológica (Warkentin e Kelton, 1995).

Diversos fármacos podem ser implicados na geração da trombocitopenia por mecanismos distintos, sendo os principais a diminuição da produção de plaquetas e a destruição imunológica das mesmas. Fármacos como benzodiazepínicos, antiinflamatórios não-hormonais, analgésicos pirazolônicos, heparina, interferon, dentre outros, são descritos como agentes com associação comprovada ou muito provável com trombocitopenia. Há, ainda, um grande número de fármacos cuja associação causal com trombocitopenia pode ser considerada pouco provável (George et al., 1998; Aster e Bougie, 2007). Trombocitopenia vem sendo relatada com freqüência durante o curso de várias infecções virais agudas como rubéola, dengue, hepatite A, mononucleose infecciosa e citomegalovirose, e crônicas como hepatites B e C e HIV/AIDS, e outras como infecção por *Helicobacter pylori* e sífilis (George e Rizvi, 2001; Campuzano-Maya, 2007). Pacientes com doença hepática crônica, particularmente naqueles com esplenomegalia congestiva por síndrome de hipertensão portal, freqüentemente, apresentam trombocitopenia (Toghill et al., 1977). Alcoolismo, gestação, hemopatias malignas, exposição a produtos químicos e agentes físicos, politransusão e deficiências vitamínicas (ácido fólico e vitamina B₁₂) também constituem causas de trombocitopenia. Trombocitopenias hereditárias e aquelas associadas à síndrome hemolítico-urêmica ou púrpura trombocitopênica trombótica ocorrem menos comumente (George e Rizvi, 2001).

Por outro lado, grande número de indivíduos trombocitopênicos, mesmo após exaustiva investigação etiológica, não apresenta causa identificada. Com base no achado de trombocitopenia isolada e púrpura de etiologia desconhecida, o diagnóstico de púrpura trombocitopênica idiopática ou imune (PTI) é estabelecido. A PTI é distúrbio hematológico adquirido caracterizado, principalmente, por destruição imunológica das plaquetas no sistema mononuclear fagocitário, predominantemente do baço, mediada por autoanticorpos dirigidos contra diferentes GP plaquetárias, mais freqüentemente GP IIb/IIIa e GP Ib/IX, sendo também denominada púrpura trombocitopênica imune primária. Alternativamente, uma via de destruição plaquetária na PTI é representada por células T citotóxicas auto-reativas. Tanto a produção de autoanticorpos antiplaquetários como a emergência de células T citotóxicas autorreativas resultam de perda na tolerância imunológica aos auto-antígenos, cujo mecanismo primário permanece desconhecido. Formas secundárias da púrpura trombocitopênica imune estão relacionadas às doenças do colágeno, doenças linfoproliferativas malignas, infecções, dentre outras (Beardsley, 2006; Cooper e Bussel, 2006; Stasi et al., 2008).

Com o objetivo de uniformizar a abordagem hematológica de pacientes com PTI, acompanhados em diferentes centros de referência, membros da Sociedade Americana de Hematologia (*American Society of Hematology* ou ASH) propuseram um conjunto de diretrizes práticas a serem adotadas para avaliação diagnóstica e terapêutica de crianças e adultos com essa enfermidade (George et al., 1996). Dessa forma, o diagnóstico da PTI passa a se basear, principalmente, na história clínica, no exame físico, nas contagens de células sanguíneas e na análise semiológica do sangue periférico, além da exclusão de outras causas de trombocitopenia. De acordo com os critérios da ASH, pacientes adultos com suspeita de PTI devem ser avaliados cuidadosamente em sua história clínica e exame físico visando às seguintes informações:

a) História clínica:

- Sintomas de sangramento (tipo, gravidade, duração, hemostasia relacionada à cirurgias prévias e gestação);
- Sintomas sugestivos de infecção recente, principalmente de etiologia viral (perda ponderal, febre, cefaléia);

- Gestação em curso;
- Sintomas sugestivos de doenças autoimunes (artralgias, erupção cutânea, alopecia);
- Uso de medicamentos que possam causar trombocitopenia ou exacerbar manifestação hemorrágica;
- Fatores de risco para infecção por HIV;
- Transfusão prévia;
- Antecedentes familiares de trombocitopenia;
- Comorbidades que possam exacerbar o risco de sangramento (doença gastrointestinal, doença neurológica, doença urológica);
- Estilo de vida, incluindo atividades físicas potencialmente traumáticas;

b) Exame físico:

- Sinais de sangramento (tipo, gravidade);
- Hepatomegalia, esplenomegalia e linfonodomegalia; icterícia e outros sinais de doença hepática;
- Evidência de infecção;
- Evidência de doença autoimune (artrite, bócio, vasculite cutânea);
- Evidência de trombose;
- Evidência de disfunção neurológica;
- Anormalidades esqueléticas.

Ainda de acordo com os critérios da ASH, com relação à contagem de células sanguíneas e à análise semiológica do sangue periférico, os achados de trombocitopenia isolada e plaquetas de tamanho normal ou macroplaquetas reforçam a hipótese diagnóstica de PTI. É desnecessária a realização, de forma rotineira, de testes laboratoriais complementares como: detecção de anticorpos antiplaquetários, contagem de reticulócitos, dosagens hormonais, análise dos elementos anormais e sedimentoscopia [EAS], teste de Coombs, raios-x de tórax, teste de sobrevivência plaquetária e detecção de IgG associada à plaqueta. Exames de imagem abdominal (ultrassonografia, tomografia computadorizada ou ressonância magnética) também são considerados desnecessários ou inapropriados. O exame

de medula óssea está recomendado para investigação da PTI em pacientes idosos ou em pacientes candidatos ao tratamento cirúrgico (esplenectomia) (George et al., 1996).

2.14.3 Trombocitopenia associada ao HCV

Com o advento dos testes sorológicos para detecção de anticorpos anti-HCV, observou-se prevalência de 9% a 25% de infecção pelo HCV em pacientes com diagnóstico prévio de PTI (Silva et al., 1992; Pawlotsky et al., 1995; Linares et al., 1996; Fabris et al., 1998; García-Suárez et al., 2000; Sakuraya et al., 2002).

A maioria dos autores considera o diagnóstico de trombocitopenia associada ao HCV quando indivíduos portadores de trombocitopenia apresentam como único fator etiológico identificado a infecção pelo HCV, sem levar em consideração qual das duas condições foi diagnosticada primeiro (Nagamine et al, 1996; Hernández et al, 1998; García-Suárez et al, 2000). Contudo, Pockros et al. (2002) sugeriram, como critério de inclusão para o diagnóstico da trombocitopenia associada ao HCV, que o diagnóstico da infecção pelo HCV deva ser feito antes ou concomitantemente com a identificação da trombocitopenia.

A etiopatogênese da trombocitopenia associada ao HCV parece ser de natureza multifatorial (Giannini e Savarino, 2008; Witters et al., 2008). Diferentes ou concomitantes mecanismos podem desempenhar papel na patogênese dessa alteração hematológica:

- a) Historicamente, a trombocitopenia comumente observada em pacientes com doença hepática crônica foi atribuída à esplenomegalia congestiva secundária à hipertensão portal (Aster, 1966; Toghil et al., 1977) e, nesse contexto, foi proposto o mecanismo de hiperesplenismo para explicar a trombocitopenia observada na infecção crônica pelo HCV. No entanto, evidências clínicas e laboratoriais de síndrome de hipertensão portal e/ou esplenomegalia não são obrigatoriamente encontradas em expressiva proporção de pacientes com trombocitopenia associada ao HCV (Nagamine et al., 1996);
- b) Um mecanismo imune foi sugerido para explicar a trombocitopenia observada nestes pacientes, a partir das seguintes linhas de evidências: i) a infecção pelo HCV

está associada a amplo espectro de manifestações extra-hepáticas autoimunes (Pawlotsky et al., 1994; Czaja, 1997; McMurray, 1998); ii) a presença de imunoglobulinas, principalmente da classe IgG, associada às plaquetas (*Platelet-associated immunoglobulin G* ou PAIgG) pôde ser demonstrada em uma proporção dos pacientes com trombocitopenia associada ao HCV, principalmente quando são utilizados os testes direto (detecção de anticorpos ligados às plaquetas) e por eluição (detecção de anticorpos eluídos das plaquetas do próprio paciente) (Nagamine et al., 1996; Fabris et al., 1998; Hernández et al., 1998; García-Suárez et al., 2000); iii) o aumento das cifras plaquetárias observado em alguns pacientes após terapia com corticosteróide oral (prednisona) e/ou imunoglobulina endovenosa (Hernández et al., 1998; García-Suárez et al., 2000; Sakuraya et al., 2002).

Por outro lado, a presença de níveis elevados de PAIgG em pacientes com hepatite viral aguda ou hepatite crônica, sem trombocitopenia, parece demonstrar que a trombocitopenia associada ao HCV não está estritamente relacionada aos níveis de PAIgG. De fato, os anticorpos IgG detectados dessa forma não representam anticorpos antiplaquetários específicos (dirigidos contra glicoproteínas plaquetárias), mas IgG inespecífica presente na superfície plaquetária e, principalmente, no interior dos grânulos alfa encontrados no citoplasma das plaquetas (Doi et al., 2002). Os ensaios para detecção de anticorpos antiplaquetários específicos em doenças de natureza claramente imunológica, como a PTI, não apresentaram sensibilidade (50%) ou especificidade (80%) suficientes para estabelecer essa relação (De Mattia et al., 2000). Contudo, recentemente, foi demonstrada a presença de anticorpos contra GP IIb/IIIa e GP Ib/IX na trombocitopenia associada ao HCV (Pockros et al., 2002);

c) Um papel patogênico direto do HCV sobre megacariócitos também foi sugerido com base na detecção de seqüências genômicas (fita positiva e fita negativa) do HCV, por hibridização *in situ*, em amostras de medula óssea de pacientes com crioglobulinemia mista tipo II (Agnello et al., 1995) e com trombocitopenia associada ao HCV (Bordin et al., 1995). Além disso, alguns estudos reportaram a detecção de seqüências genômicas (fita positiva) do HCV, utilizando-se a técnica RT-PCR, em plaquetas do sangue periférico (Silva et al., 1992; Nagamine et al., 1996; Hamaia et al., 2001);

d) Os níveis séricos de trombopoetina correlacionam-se positivamente com o grau de disfunção hepatocelular e inversamente com o estágio de fibrose hepática. Dessa forma, a diminuição da produção de trombopoetina parece representar, juntamente com o hiperesplenismo, os mecanismos mais importantes da trombocitopenia em cirróticos HCV-positivos (Adinolfi et al., 2001; Giannini et al., 2002).

Os pacientes com trombocitopenia associada ao HCV apresentam características clínicas muito semelhantes às aquelas observadas na PTI crônica, tais como: frequência maior entre mulheres, curso clínico estável e risco mínimo para o desenvolvimento de sangramento grave (Hernández et al., 1998; García-Suárez et al., 2000). O risco de sangramento, comprometendo principalmente pele e mucosas, bem como a sua gravidade, estão relacionados com o grau de trombocitopenia, sendo os mais graves freqüentemente observados em pacientes com contagens plaquetárias abaixo de $50.000/\text{mm}^3$ (Bauduer et al., 1998; Hernández et al., 1998; García-Suárez et al., 2000; Ramos-Casals e Font, 2005).

Na abordagem diagnóstica, a maioria dos estudos enfatiza a adoção de critérios recomendados pela ASH (George et al., 1996). Embora não haja consenso com relação à necessidade de se realizar estudo morfológico rotineiro da medula óssea em pacientes com trombocitopenia associada ao HCV, um número normal ou aumentado de megacariócitos pode ser observado nesses pacientes (Durand et al., 1993; Hernández et al., 1998).

Do ponto de vista hematológico, o tratamento da trombocitopenia associada ao HCV apresenta resultados pouco animadores. O tratamento de curta duração à base de corticosteróide oral (prednisona) ou gamaglobulina intravenosa em doses convencionais para PTI tem se mostrado ineficaz em produzir elevações sustentadas da contagem de plaquetas em alguns estudos (Durand et al., 1993; Linares et al., 1996; Bauduer et al., 1998; Fabris et al., 1998; Pockros et al., 2002; Sakuraya et al., 2002) e parece não afetar o curso clínico da doença hepática causada pelo HCV (Hernández et al., 1998). Recentemente, McHutchison et al. (2007) realizaram ensaio clínico de fase 2, randomizado, duplo-cego, controlado com placebo, visando à análise da eficácia de agonista do receptor da trombopoetina, como o eltrombopague, para o tratamento de pacientes

trombocitopênicos com cirrose hepática relacionada ao HCV. Esse estudo revelou que 95% dos pacientes que receberam 75 mg de eltrombopague por via oral, em dose diária única, apresentaram resposta plaquetária acima de $100.000/\text{mm}^3$ na quarta semana de terapia com esse medicamento, tendo a cefaléia como efeito adverso mais freqüente nas primeiras quatro semanas de terapia. Além disso, a terapia antiviral (interferon peguilado alfa e ribavirina) pôde ser iniciada em 21/23 (91%) pacientes que receberam essa dose de eltrombopague, e 15/23 (65%) pacientes conseguiram completar as 12 primeiras semanas de terapia antiviral.

Com relação à terapia antiviral, há um número menor de publicações na literatura. Série de seis pacientes tratados com interferon- $\alpha 2b$, três milhões de unidades por via subcutânea, três vezes por semana, por período de 6 a 24 meses, apenas um apresentou normalização da contagem plaquetária ao final de 24 meses de seguimento, os demais apresentaram resposta parcial (García-Suárez et al., 2000). Outro estudo envolvendo oito pacientes tratados com interferon- $\alpha 2a$, três milhões de unidades por via subcutânea, três vezes por semana, por período de 6 a 24 semanas, revelou que três não apresentaram resposta plaquetária e cinco apresentaram resposta plaquetária parcial (Rajan e Liebman, 2001). Outros grupos de pesquisadores relataram casos isolados de resposta hematológica considerada satisfatória após terapia com interferon- α (Durand et al., 1994; Uygun et al., 2000) e com a associação interferon- $\alpha 2b$ / ribavirina (Lagasse et al., 2001). Por outro lado, o tratamento com interferon pode contribuir para o agravamento da trombocitopenia associada ao HCV (Peck-Radosavljevic et al., 2002; Dieterich e Spivak, 2003; Curry e Afdhal, 2005; Moreno-Otero, 2005).

3 RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA

A hepatite C crônica constitui grave problema de saúde pública, não apenas pelo enorme número de indivíduos infectados em todo o mundo, mas também pelas complicações, incluindo manifestações extra-hepáticas. A trombocitopenia associada ao HCV é uma das alterações extra-hepáticas mais frequentes na hepatite C crônica. Fatores que determinam o desenvolvimento de anormalidades extra-hepáticas como trombocitopenia relacionada ao HCV ainda não são conhecidos. O achado de trombocitopenia associada ao HCV pode comprometer os resultados do tratamento antiviral que consiste, atualmente, na combinação de interferon com ribavirina, uma vez que esta combinação pode agravar essa alteração hematológica resultando na interrupção do tratamento antiviral. Além disso, não existe tratamento eficaz para a trombocitopenia associada ao HCV (Dieterich e Spivak, 2003; Moreno-Otero, 2005; Curry e Afdhal, 2005).

O tratamento antiviral representa procedimento de custo elevado e associado a uma gama de efeitos colaterais, além de ser eficaz em menos da metade dos pacientes com hepatite C crônica. O estudo mais aprofundado dos fatores relacionados à interação do HCV com plaquetas do sangue periférico poderá contribuir para melhor abordagem clínico-terapêutica dos pacientes com trombocitopenia associada ao HCV.

A infecção pelo HCV, além de seu hepatotropismo, pode acometer outros órgãos do corpo humano, gerando diversas alterações extra-hepáticas, como a trombocitopenia. Historicamente, a trombocitopenia associada à doença hepática crônica foi atribuída principalmente à esplenomegalia congestiva secundária à síndrome de hipertensão portal. Entretanto, esse achado não foi observado em muitos pacientes com trombocitopenia associada ao HCV. Dessa forma, outros mecanismos foram sugeridos para explicar a trombocitopenia em pacientes com infecção crônica pelo HCV. Em estudo retrospectivo realizado durante o período de

novembro de 1994 a novembro de 1997 envolvendo 398 pacientes infectados por vírus hepatotrópicos, atendidos no Ambulatório de Gastroenterologia do Hospital Universitário Gaffrée e Guinle (HUGG), da Escola de Medicina e Cirurgia da Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro (UNIRIO), foram registrados 223 (56%) pacientes anti-HCV positivos (EIE – 2ª geração), dos quais 38 (17%) apresentavam alterações hematológicas. Dos 38 pacientes com alterações hematológicas, 20 (52,6%) apresentavam trombocitopenia (plaquetas < 150.000/mm³) e, desses, oito (40%) não apresentavam sinais de hipertensão portal (Almeida et al., 1998).

De fato, em nossa experiência no Ambulatório de Hematologia do HUGG/UNIRIO, observamos que a partir de 1997 um número maior de pacientes com infecção crônica pelo HCV, provenientes do Ambulatório de Gastroenterologia e, posteriormente, do Ambulatório de Doenças do Fígado do HUGG, foram encaminhados para investigação dessa alteração hematológica, nos quais evidências de esplenomegalia e/ou hipertensão portal estavam ausentes.

Até o presente momento, poucos são os trabalhos que demonstraram a presença de seqüências genômicas do HCV nas plaquetas, e as implicações desses estudos são que as plaquetas podem servir como elementos de seqüestro de vírions evitando o reconhecimento imunológico. Também se postula que as plaquetas possam representar importantes reservatórios do HCV, responsáveis pela quase totalidade das re-infecções após transplante de fígado (Silva et al., 1992; Nagamine et al., 1996; Alter, 2001; Hamaia et al., 2001).

A associação entre genótipo viral e manifestação extra-hepática não é bem conhecida, permanecendo questão aberta saber se o genótipo do HCV constitui um fator determinante de patogenicidade distinta, especificamente a trombocitopenia. Embora os fatores virais e do hospedeiro associados à resposta terapêutica em pacientes com infecção crônica pelo HCV estejam bem documentados na literatura, não é conhecida a relação entre tais fatores e a detecção do HCV em plaquetas do sangue periférico, assim como a influência desta compartimentalização sobre a terapia antiviral. A fim de melhor caracterizar o papel da detecção do HCV em plaquetas na patogênese da trombocitopenia associada ao HCV, bem como fatores virais e do hospedeiro que possam influenciar a taxa de detecção do HCV nas

plaquetas e o resultado do tratamento antiviral, realizamos este trabalho de tese, de caráter multicêntrico, envolvendo duas unidades: Laboratório de Hepatites Virais do Instituto Oswaldo Cruz (IOC)/Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) e Hospital Universitário Gaffrée e Guinle, da Escola de Medicina e Cirurgia (EMC)/Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro (UNIRIO).

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo Geral

– Estudar a relação entre detecção qualitativa do HCV-RNA em plaquetas do sangue periférico e trombocitopenia associada ao HCV, bem como avaliar sua relação com fatores virais e do hospedeiro, e sua influência sobre a resposta ao tratamento antiviral, em um grupo de pacientes com hepatite C crônica atendidos no Hospital Universitário Gaffrée e Guinle da Escola de Medicina e Cirurgia (EMC)/Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro (UNIRIO).

4.2 Objetivos Específicos

- Investigar a presença do HCV-RNA em plaquetas do sangue periférico e sua relação com a trombocitopenia associada ao HCV;
- Estimar a prevalência dos genótipos do HCV, pela análise por seqüenciamento nucleotídico da região core do genoma viral em amostras de soro, bem como determinar se a trombocitopenia associada ao HCV constitui manifestação extra-hepática genótipo-dependente;
- Investigar a relação entre detecção qualitativa do HCV em plaquetas do sangue periférico e fatores virais (genótipo e carga viral) e do hospedeiro (demográficos, clínicos e laboratoriais);
- Analisar a influência da detecção do HCV em plaquetas do sangue periférico sobre a resposta ao tratamento antiviral;
- Descrever as características clínicas e laboratoriais, bem como a resposta terapêutica de uma série de casos de trombocitopenia auto-imune associada ao HCV.

5 DESENHO

A coorte de estudo foi constituída de pacientes com infecção crônica pelo HCV. A admissão dos pacientes selecionados na presente pesquisa foi iniciada em agosto de 2001. A Figura 5.1 ilustra as etapas da pesquisa e seus respectivos desenhos.

Essa pesquisa foi aprovada pela Comissão de Ética em Pesquisa do HUGG (MEMO CEP / N^o 32 / 2004, em 30 de agosto de 2004) (Anexo A).

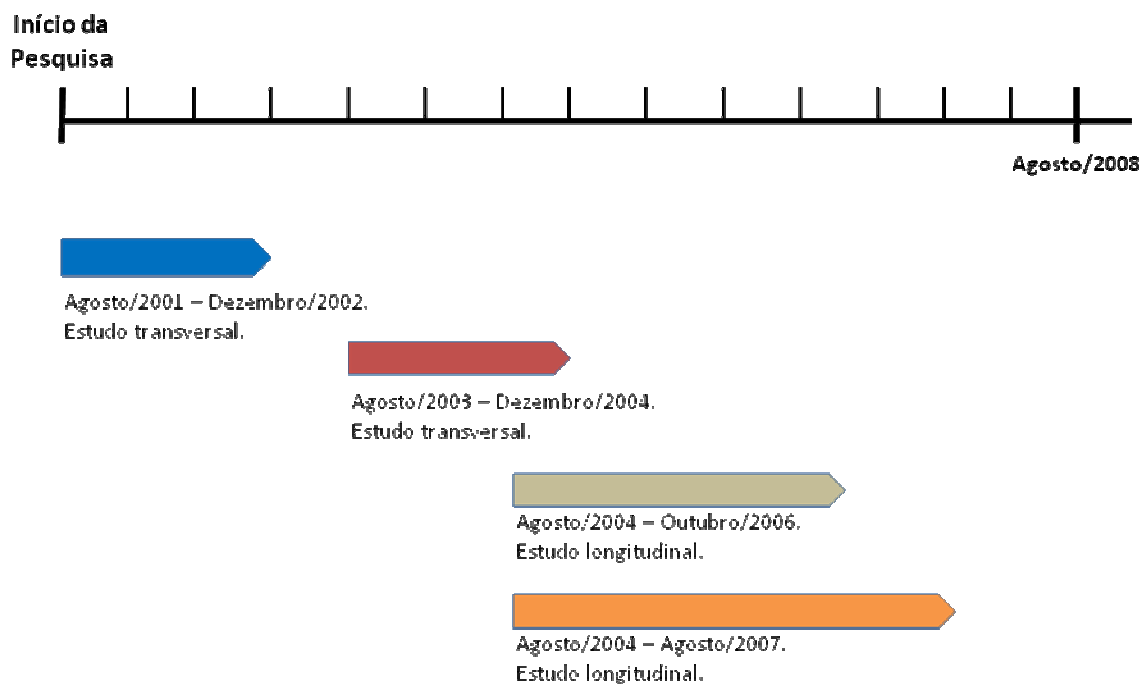


Figura 5.1. Representação esquemática das etapas da pesquisa e seus respectivos desenhos ao longo do período de estudo (2001-2007).

6 RESULTADOS

Os resultados obtidos nesta pesquisa são apresentados na forma de manuscritos publicados, aceitos para publicação ou submetidos para publicação em revistas científicas indexadas nas bases de dados PubMed, MEDLINE e ISI Web of Knowledge [v. 4.2], e listados a seguir na ordem em que os referidos manuscritos foram discutidos:

a) de Almeida AJ, Campos-de-Magalhães M, de Melo Marçal OP, Brandão-Mello CE, Okawa MY, de Oliveira RV, do Espírito-Santo MP, Yoshida CF, Lampe E. Hepatitis C virus-associated thrombocytopenia: a controlled prospective, virological study. *Ann Hematol* 2004 Jul;83(7):434-40.

b) de Almeida AJ, Campos-de-Magalhães M, Brandão-Mello CE, de Oliveira RV, Yoshida CF, Lampe E. Detection of hepatitis C virus in platelets: evaluating its relationship to viral and host factors. *Hepatogastroenterology* 2007 Apr-May;54(75):964-8.

c) de Almeida AJ, Campos-de-Magalhães M, Brandão-Mello CE, de Oliveira RV, do Espírito-Santo MP, Yoshida CF, Lampe E. Detection of Hepatitis C Virus in Platelets: Evaluating its Relationship to Antiviral Therapy Outcome. Submetido para publicação na revista *Hepato-Gastroenterology* em 19 de novembro de 2007. Aceito para publicação na revista *Hepato-Gastroenterology* em 10 de dezembro de 2007 (Anexo B).

d) de Almeida AJ, Campos-de-Magalhães M, Antonietti CL, Brandão-Mello CE, da Silva MLP, de Oliveira RV, do Espírito-Santo MP, Yoshida CF, Lampe E. Autoimmune thrombocytopenia related to chronic hepatitis C virus infection. Submetido para publicação na revista *Hematology* em 11 de junho de 2008 (Anexo C).

6.1 Artigo 1

de Almeida AJ, Campos-de-Magalhães M, de Melo Marçal OP, Brandão-Mello CE, Okawa MY, de Oliveira RV, do Espírito-Santo MP, Yoshida CF, Lampe E. Hepatitis C virus-associated thrombocytopenia: a controlled prospective, virological study. *Ann Hematol* 2004;83(7):434-40.

6.2 Artigo 2

de Almeida AJ, Campos-de-Magalhães M, Brandão-Mello CE, de Oliveira RV, Yoshida CF, Lampe E. Detection of hepatitis C virus in platelets: evaluating its relationship to viral and host factors. *Hepatogastroenterology* 2007;54(75):964-8.

O presente artigo também foi apresentado como tema livre em evento científico de caráter nacional, em 2005. Por ocasião do XVIII Congresso Brasileiro de Hepatologia da Sociedade Brasileira de Hepatologia, realizado em Campos do Jordão, SP, no período de 19 a 22 de outubro de 2005, o trabalho "*Influência da carga viral do HCV-RNA na detecção do vírus da hepatite C (HCV) nas plaquetas do sangue periférico*" foi apresentado em forma de pôster (de Almeida AJ et al. *GED Gastroenterol Endosc Dig* 2005;24(Supl 2):S67-S68 [PO-259]) e recebeu o título de MENÇÃO HONROSA.

6.3 Artigo 3

de Almeida AJ, Campos-de-Magalhães M, Brandão-Mello CE, de Oliveira RV, do Espírito-Santo MP, Yoshida CF, Lampe E. Detection of hepatitis C virus in platelets: evaluating its relationship to antiviral therapy outcome. *Hepatogastroenterology* 2008 (no prelo).

O presente artigo também foi apresentado como tema livre em eventos científicos de caráter nacional, em 2007. Por ocasião do XVIII Encontro Nacional de Virologia, realizado em Armação dos Búzios, RJ, no período de 14 a 17 de outubro de 2007, o trabalho "*Occult hepatitis C vírus (HCV)-RNA detection in peripheral blood platelets from patients receiving antiviral therapy*" foi apresentado em forma oral (de Almeida AJ et al. *Virus Rev Res* 2007;12(Supl 1):74 [OP-4]) na Mesa Redonda "*Human Virology*" e indicado para concorrer ao prêmio "Jussara Nascimento". O referido trabalho também foi selecionado para apresentação oral (de Almeida AJ et al. *Rev Bras Hematol Hemoter* 2007;29(Supl 3):73 [0171]) no Congresso Brasileiro de Hematologia e Hemoterapia (HEMO 2007), realizado em São Paulo, SP, no período de 7 a 10 de novembro de 2007, e concorreu ao prêmio como melhor trabalho na área de Hemoterapia.

6.4 Artigo 4

de Almeida AJ, Campos-de-Magalhães M, Antonietti CL, Brandão-Mello CE, da Silva MLP, de Oliveira RV, do Espírito-Santo MP, Yoshida CF, Lampe E. Autoimmune thrombocytopenia related to chronic hepatitis C virus infection. Submetido para publicação na revista Hematology em 11 de junho de 2008.

7 DISCUSSÃO

A infecção crônica pelo HCV pode ser considerada como doença multissistêmica, uma vez que diversas manifestações extra-hepáticas, incluindo a trombocitopenia, foram descritas em associação à infecção crônica pelo HCV. A patogênese da trombocitopenia associada ao HCV não é completamente conhecida, porém uma variedade de mecanismos patogênicos foi descrita na literatura, tais como: hiperesplenismo, produção de autoanticorpos antiplaquetários, produção insuficiente de trombopoetina, interação entre partículas virais e megacariócitos e/ou plaquetas do sangue periférico. Embora seja vírus essencialmente hepatotrópico, vários estudos revelaram detecção do HCV-RNA em sítios extra-hepáticos como diferentes subpopulações de células mononucleares do sangue periférico, incluindo linfócitos B, linfócitos T, monócitos e células dendríticas, e plaquetas do sangue periférico (Lerat et al., 1998; Ramos-Casals e Font, 2005; Zehender et al., 2005; Di Liberto et al., 2006; Januszkiewicz-Lewandowska et al., 2007; Pham e Michalak, 2008).

Com relação à detecção do HCV-RNA em plaquetas, diferentes estudos demonstraram taxas de detecção variando entre 0% e 100% (Silva et al., 1992; Li et al., 1994; Takehara et al., 1994; Nagamine et al., 1996; Hamaia et al., 2001). Silva et al. (1992) analisaram retrospectivamente o soro de 112 pacientes com diagnóstico prévio de PTI, dos quais 21 (18,7%) apresentaram anticorpos anti-HCV em dois testes imunoenzimáticos de segunda geração. Os investigadores também demonstraram pela primeira vez a presença de HCV-RNA por PCR em amostras de soro e plaquetas de quatro pacientes com PTI estudados na sua série. Contudo, a determinação da prevalência de HCV-RNA em plaquetas de pacientes com trombocitopenia e sua relação com a trombocitopenia foi dificultada por se tratarem de estudos não-controlados, de pequeno tamanho amostral e com testagem de parte do grupo de indivíduos trombocitopênicos. A fim de investigar a associação

entre presença do HCV-RNA (fita positiva) nas plaquetas e trombocitopenia, bem como a associação entre genótipos do HCV e essa alteração hematológica, realizamos estudo prospectivo em coorte de 106 pacientes com hepatite C crônica, atendidos no HUGG/UNIRIO (de Almeida et al., 2004). Neste estudo, foi possível detectar a presença de seqüências genômicas do HCV em plaquetas utilizando-se técnica de transcrição reversa seguida de amplificação mediada pela reação em cadeia da polimerase (RT-*nested* PCR), com *primers* dirigidos para região 5'NC do genoma viral, demonstrando que as plaquetas podem representar reservatórios em potencial para o HCV. Taxa de detecção do HCV-RNA significativamente maior ($p=0,017$) entre os pacientes trombocitopênicos quando comparados com os não-trombocitopênicos também foi registrada neste estudo. Durante o seguimento dos pacientes, seis pacientes do grupo dos não trombocitopênicos ($n=49$) tornaram-se trombocitopênicos, dos quais quatro pacientes apresentavam HCV-RNA detectado em plaquetas quando da admissão no estudo. Com relação aos outros dois pacientes que se tornaram trombocitopênicos (com HCV-RNA não detectado nas plaquetas coletadas no início do estudo), um apresentou HCV-RNA detectado nas plaquetas coletadas à época em que se tornaram trombocitopênicos. Além disso, aumento ou mesmo normalização da contagem de plaquetas (resposta plaquetária) após tratamento antiviral de pacientes com hepatite C crônica (García-Suárez et al., 2000; Uygun et al., 2000; Lagasse et al., 2001; Rajan e Liebman, 2001; Benci et al., 2003) constitui evidência clínica que reforça a hipótese que o HCV pode estar envolvido, pelo menos em parte, no processo que leva ao desenvolvimento da trombocitopenia.

Vem sendo sugerido que a presença de seqüências genômicas do HCV nas plaquetas pode refletir apenas adsorção de partículas virais à superfície plaquetária por mecanismo independente do receptor CD81, uma vez que plaquetas não expressam fenótipo CD81 em sua superfície (Hamaia et al., 2001). Outras moléculas candidatas a receptores celulares do HCV como receptor para LDL e SR-BI também não são expressos na superfície plaquetária (Lavillette et al., 2005). Nesse contexto, a presença de receptores para a fração Fc da imunoglobulina G na superfície plaquetária parece representar alternativa viável (Parise et al., 2001), já que 95% dos vírions do HCV permanecem no sangue circulante em sua forma complexada a

IgG (Alter, 2001). É possível também que algumas características da ultraestrutura plaquetária, particularmente o seu aspecto espongiiforme resultante da existência de sistema canalicular aberto e formado a partir de invaginações da membrana plasmática, possam permitir adsorção passiva (inespecífica) de partículas livres e complexadas do HCV em proporções aproximadamente iguais às plaquetas (Hamaia et al, 2001; Parise et al., 2001). Como implicações dessas descobertas, plaquetas poderiam transportar partículas virais do HCV para locais de reconhecimento imunológico ou, alternativamente, seqüestrá-las e, assim, funcionar como importantes reservatórios do HCV (Alter, 2001). A possibilidade das plaquetas constituírem sítio extra-hepático de replicação viral foi demonstrada em estudo preliminar envolvendo a detecção da fita negativa (replicativo intermediário) do HCV pela RT-*nested* PCR em plaquetas do sangue periférico de 17/19 pacientes anti-HCV+/HCV-RNA+ (Floreani et al., 1996).

Estudos (Mondelli e Silini, 1999; Zein, 2000) demonstraram a importância da determinação dos genótipos do HCV na avaliação da resposta à terapia antiviral, porém a relação de determinados genótipos do HCV com a patogenicidade, particularmente com a gravidade da doença hepática, permanece como questão controversa. Com relação às manifestações extra-hepáticas, um número limitado de estudos foi realizado no sentido de esclarecer a associação entre determinados genótipos e manifestações extra-hepáticas relacionadas à infecção crônica pelo HCV. Pawlotsky et al. (1995) estudaram prospectivamente 59 pacientes com hepatite C crônica, na França, e relataram alta prevalência de anormalidades imunológicas (crioglobulinas, fator reumatóide, anticorpo anti-tireoglobulina, anticorpo antinuclear, dentre outras) nesses pacientes, porém relação de associação entre essas anormalidades e os genótipos 1, 2 e 3 não foi observada.

A quase totalidade das séries de casos de trombocitopenia associada ao HCV publicadas na literatura não faz menção a respeito da prevalência dos genótipos do HCV neste grupo de pacientes (Silva et al., 1992; Nagamine et al., 1996; Hernández et al., 1998; García-Suárez et al., 2000; Rajan e Liebman, 2001; Sakuraya et al., 2002). Pockros et al. (2002), com base na análise retrospectiva dos registros médicos, relataram sete casos de púrpura trombocitopênica imune dentre 3440 pacientes com infecção crônica pelo HCV diagnosticados entre 1995 e 1999, em

uma clínica da Califórnia, EUA, dos quais apenas três casos tiveram genótipo determinado: 1a (1 caso) e 1b (2 casos). No presente estudo, a distribuição dos genótipos mais prevalentes (1a, 1b e 3) nos dois grupos de pacientes com infecção crônica pelo HCV não diferiu significativamente ($p=0,891$), sugerindo que um ou mais fatores podem estar interagindo simultaneamente, independente do genótipo viral, no desenvolvimento de trombocitopenia em pacientes com infecção crônica pelo HCV. Entretanto, a participação de outros genótipos ou subtipos do HCV não pode ser descartada e merece investigação mais aprofundada.

Diversos fatores virais e do hospedeiro podem influenciar a taxa de resposta virológica sustentada em pacientes com infecção crônica pelo HCV, tais como: sexo, idade, estágio de fibrose hepática, genótipo viral e carga viral. Contudo, a análise dos fatores virais e do hospedeiro que podem influenciar a taxa de detecção do HCV-RNA em sítios extra-hepáticos não é bem conhecida. Lerat et al. (1998), ao estudarem a influência do genótipo e da carga viral sobre a taxa de detecção do HCV em células mononucleares do sangue periférico de 38 pacientes infectados cronicamente por diferentes genótipos do HCV, concluíram ser a detecção do HCV em células mononucleares do sangue periférico evento independente do genótipo e da carga viral do HCV. A fim de determinar a relação entre detecção qualitativa do HCV-RNA em plaquetas do sangue periférico e diversos fatores virais e do hospedeiro, realizamos estudo com delineamento transversal, envolvendo coorte de 39 pacientes com hepatite C crônica, atendidos no HUGG/UNIRIO (de Almeida et al., 2007). Neste estudo, foram analisados fatores como sexo, idade, níveis de transaminases séricas (TGO e TGP), contagem de plaquetas, fibrose hepática, genótipo viral, carga viral, dentre outros. Os resultados obtidos no presente estudo não demonstraram qualquer relação ($p>0,05$) entre tais fatores e detecção qualitativa do HCV-RNA em plaquetas, sugerindo que a interação entre partículas do HCV e plaquetas parece estar relacionada a outros fatores.

Estudo recente não revelou diferenças significantes entre valores de carga viral no soro quando foram comparados dois grupos de pacientes, trombocitopênicos (contagem de plaquetas $< 150.000/\text{mm}^3$) e não-trombocitopênicos (Ida et al., 2005). Contudo, o referido estudo não investigou a detecção qualitativa do HCV-RNA nas plaquetas. Hamaia et al. (2001) sugeriram que, além da possível existência de

receptores específicos na superfície das plaquetas modulando a ligação do HCV a essas células, a morfologia singular das plaquetas poderia resultar em adsorção inespecífica das partículas virais às plaquetas. Dessa forma, seria esperado que os valores de carga viral no soro apresentassem correlação positiva com a taxa de detecção do HCV-RNA nas plaquetas. De forma surpreendente, no presente estudo não foi observada relação entre valores de carga viral no soro e taxa de detecção qualitativa do HCV-RNA em plaquetas, uma vez que HCV-RNA foi detectado em plaquetas de pacientes com baixa carga viral e vice-versa, sugerindo que a interação entre HCV e plaquetas parece ocorrer independentemente da quantidade de partículas circulantes. Estes resultados parecem indicar que, provavelmente, a ligação do HCV às plaquetas pode não estar relacionada à adsorção inespecífica na superfície das plaquetas. Estudos mais recentes sugeriram que dois receptores de superfície podem estar envolvidos na interação entre HCV e plaquetas: fibronectina e GP VI (Pugliese et al., 2004; Zahn et al., 2006).

Por outro lado, a influência da detecção qualitativa do HCV-RNA em sítios extra-hepáticos, principalmente células mononucleares do sangue periférico, sobre a resposta ao tratamento antiviral foi analisada em diferentes ensaios clínicos e permanece controversa (Taliani et al., 1995; Gong et al., 2003; Radkowski et al., 2005; Januszkiewicz-Lewandowska et al., 2007). Considerando-se que diferentes estudos demonstraram a presença do HCV-RNA em plaquetas (Silva et al., 1992; Li et al., 1994; Takehara et al., 1994; Nagamine et al., 1996; Hamaia et al., 2001), deve-se esperar que o tratamento antiviral seja capaz de eliminar o HCV desses locais. Além disso, o impacto da detecção do HCV-RNA em plaquetas sobre a resposta terapêutica não é conhecido. Com objetivo de investigar a relação entre detecção qualitativa do HCV em plaquetas do sangue periférico e resposta ao tratamento antiviral, realizamos estudo com delineamento longitudinal, envolvendo coorte de 48 pacientes com hepatite C crônica, atendidos no HUGG/UNIRIO (de Almeida, 2008). Neste estudo, a detecção do HCV-RNA foi realizada em amostras pareadas de soro e plaquetas em diferentes períodos do tratamento antiviral (pré-tratamento, ao final do tratamento e 24 semanas após término do tratamento).

Embora, no presente estudo, a detecção do HCV-RNA em plaquetas coletadas antes do início do tratamento antiviral não foi fator relacionado à resposta

terapêutica, observamos associação significativa entre taxa de detecção do HCV nas plaquetas e persistência viral no soro ao final do tratamento ($p=0,0203$), e 24 semanas após término da terapia ($p=0,0016$). Além disso, a eliminação do HCV nas plaquetas ao final do tratamento foi significativamente associada à resposta virológica sustentada (RVS) ($p=0.0096$). Outros fatores relacionados à resposta ao tratamento antiviral também foram abordados neste estudo, e, com base em critérios de resposta primária, observamos que a taxa de resposta virológica 24 semanas após o término da terapia antiviral (RVS) foi significativamente maior no grupo de pacientes com idade abaixo de 40 anos, níveis séricos mais baixos de TGP e γ -GT, fibrose hepática em estágio inicial e contagem plaquetária $> 150.000/\text{mm}^3$. Estes dados vão de encontro aos citados na literatura atual, já que pacientes com idade acima de 40 anos, fibrose acentuada ou cirrose hepática e presença de trombocitopenia foram considerados fatores relacionados à menor taxa de RVS (Ferrenci, 2004; Hughes e Shafran, 2006; Afdhal e McHutchison, 2007).

As diferenças nas taxas de detecção do HCV-RNA entre amostras pareadas de soro e plaquetas, coletadas em diferentes momentos do tratamento antiviral, parecem refletir o papel dessas células como reservatórios em potencial para o HCV e/ou diferentes aspectos da eliminação do HCV neste compartimento extra-hepático em pacientes que estão sob tratamento antiviral. Estudos prévios visando à detecção do HCV-RNA em amostras pareadas de soro e células mononucleares do sangue periférico de pacientes em tratamento para hepatite C crônica demonstraram que a detecção do HCV-RNA no soro não implica necessariamente na eliminação ou persistência do HCV-RNA nessas células (Torres et al., 2000; Trimoulet et al., 2000; Pugnale et al., 2008).

De acordo com as diretrizes de consenso da Associação Européia para o Estudo do Fígado (*European Association for the Study of Liver* ou EASL) (1999) e do NIH/EUA (2002), a detecção do HCV-RNA em amostras de soro ou plasma constitui o método padrão-ouro para diagnóstico e monitoramento terapêutico da infecção pelo HCV. Além disso, a obtenção de amostra adicional de fígado ao final do tratamento ou a detecção do HCV-RNA em sítios extra-hepáticos durante o tratamento antiviral não foi recomendada como procedimento rotineiro na conduta diagnóstica e terapêutica da infecção pelo HCV. Castillo et al. (2004) estudaram

coorte de 100 pacientes com doença hepática crônica de etiologia desconhecida, que apresentavam anti-HCV e HCV-RNA indetectáveis no soro. A presença de HCV-RNA (fita positiva) em amostras de fígado foi demonstrada pela RT-PCR e/ou hibridização *in situ* em 57% dos pacientes estudados, e desses, 40 (70%) apresentaram HCV-RNA detectado em células mononucleares do sangue periférico, caracterizando nova condição chamada infecção oculta pelo HCV. Posteriormente, Carreño (2006) também classificou como infecção oculta casos que apresentavam os seguintes critérios:

- a) Indivíduos com níveis séricos persistentemente normais de TGO e TGP, e anti-HCV positivos, porém com viremia indetectável. Entre 85% e 90% desses indivíduos apresentam HCV-RNA intra-hepático detectado, e aproximadamente 50% apresentam HCV-RNA detectado em células mononucleares do sangue periférico;
- b) Indivíduos com níveis séricos persistentemente normais de TGO e TGP, e anti-HCV positivos, que apresentaram resposta virológica após tratamento antiviral (com base na detecção do HCV-RNA no soro), porém evoluíram com recidiva da infecção após terapia com agente imunossupressor como prednisona;
- c) E indivíduos que apresentaram RVS (com base na detecção do HCV-RNA no soro), porém com persistência do HCV-RNA em amostras de fígado e/ou células mononucleares do sangue periférico.

De modo interessante, pudemos registrar em nosso estudo dois pacientes com níveis séricos normais de TGP e que apresentaram HCV-RNA não detectado no soro ao final do tratamento, nos quais se pôde detectar HCV-RNA em plaquetas coletadas ao final do tratamento, porém após 24 semanas de seguimento HCV-RNA foi detectado no soro destes pacientes. Estes dados sugerem que pacientes com detecção oculta do HCV em plaquetas ao final do tratamento parecem apresentar risco aumentado para recidiva da infecção. Recentemente, Maylin et al. (2008) realizaram estudo longitudinal com o objetivo de investigar a presença de HCV-RNA em amostras de soro, fígado e células mononucleares do sangue periférico, de pacientes com hepatite C crônica que apresentaram RVS após tratamento antiviral. Nesse estudo, a detecção de HCV-RNA, por meio da técnica TMA (com limite de detecção inferior a 9,6 UI/mL), foi observada em 2/114 (1,7%) das amostras de fígado.

Lerat e Hollinger (2004) sugeriram que esta condição deva ser corretamente reconhecida como detecção oculta do HCV, uma vez que o risco de transmissão do HCV por amostras biológicas extra-hepáticas ainda não está bem caracterizado. Contudo, procurando confirmar esta hipótese, Schüttler et al. (2000) relataram a transmissão do HCV por transfusão de concentrados de plaquetas obtidos a partir de doador em período de janela imunológica para a infecção pelo HCV (anti-HCV/HCV-RNA negativo). Posteriormente, o doador apresentou soroconversão, e a comparação das seqüências nucleotídicas, obtidas das regiões core e HVR 1 do HCV das amostras do doador e do receptor de concentrados de plaquetas, mostrou que eram seqüências idênticas.

Por fim, há fortes indícios na literatura sugerindo que o mecanismo autoimune possa estar envolvido no desenvolvimento de uma variedade de alterações extra-hepáticas, principalmente tireoidite autoimune, síndrome de Sjögren, glomerulonefrite proliferativa e artrite (Vassilopoulos e Calabrese, 2005; García-Carrasco e Escárcega, 2006; Okuse et al., 2007). A detecção de anticorpos antiplaquetários específicos em pacientes com trombocitopenia associada ao HCV foi registrada em poucos estudos (Pockros et al., 2002; Kajihara et al., 2003; Panzer et al., 2006). É importante ressaltar que a investigação concomitante de outros mecanismos patogênicos propostos não foi realizada nesses estudos. Com objetivo de estudar as características clínicas, laboratoriais e virológicas, bem como resposta terapêutica e curso evolutivo de pacientes com trombocitopenia autoimune relacionada ao HCV, descrevemos uma série de casos nos quais nenhum outro mecanismo proposto envolvido na patogênese da trombocitopenia associada ao HCV foi identificado. No presente estudo, a detecção de anticorpos antiplaquetários circulantes foi realizada utilizando-se um ensaio imunoenzimático de fase sólida capaz de detectar a presença de anticorpos dirigidos contra epítomos presentes em várias GP plaquetárias como GP IIb/IIIa, GP Ia/IIa e GP Ib/IX. Como resultado desse estudo, 10 entre 40 pacientes com trombocitopenia associada ao HCV acompanhados no HUGG/UNIRIO durante o período de 2004-2007 apresentaram evidências de destruição imunológica das plaquetas¹.

¹Artigo submetido para publicação na revista Hematology em 11 de junho de 2008 (de Almeida AJ, Campos-de-Magalhães M, Antonietti CL, Brandão-Mello CE, da Silva MLP, de Oliveira RV, do Espírito-Santo MP, Yoshida CF, Lampe E. Autoimmune thrombocytopenia related to chronic hepatitis C virus infection).

Apesar da constatação de que anticorpos antiplaquetários constituem achado freqüente na trombocitopenia associada ao HCV, admite-se que a detecção desses autoanticorpos *per se* não é suficiente para se estabelecer diagnóstico de trombocitopenia autoimune relacionada ao HCV, uma vez que pacientes não-trombocitopênicos podem apresentar títulos elevados de anticorpos antiplaquetários circulantes (Panzer et al, 2006).

Contudo, na série de casos aqui estudados, várias evidências corroboram a participação de mecanismo autoimune na trombocitopenia associada ao HCV: (a) detecção de anticorpos antiplaquetários específicos contra diferentes GP plaquetárias; (b) infecção crônica pelo HCV diagnosticada antes ou concomitantemente ao achado de trombocitopenia isolada; (c) ausência de evidências que apontem para outro(s) mecanismo(s) envolvido(s) na patogênese da trombocitopenia associada ao HCV como hiperesplenismo, produção ineficiente de trombopoetina, detecção de HCV-RNA em plaquetas e alterações morfológicas ou quantitativas dos megacariócitos; e (d) documentação de resposta plaquetária após tratamento convencional para PTI como corticosteróides e imunoglobulina anti-D.

Os mecanismos pelos quais a infecção pelo HCV é capaz de levar ao desenvolvimento de alterações auto-imunes são pouco conhecidos. A presença do HCV em linfócitos B, bem como o estímulo crônico do sistema imunológico por esse vírus, parece desempenhar papel na fisiopatologia da proliferação de células B encontradas em pacientes com infecção crônica pelo HCV (Landau et al., 2007; Zignego et al., 2007b). Estudo de caso-controle, prospectivo, envolvendo 61 pacientes com hepatite C crônica registrou prevalência de 41% de detecção de anticorpos contra diferentes componentes teciduais, como anticorpos antitireoglobulina, antitireoperoxidase, antimitocôndria, antimúsculo liso, antinucleares, dentre outros (Pawlotsky et al., 1994). Outro estudo envolvendo 35 pacientes com citopenias autoimunes graves associadas à infecção crônica pelo HCV revelou que em 19 (68%) pacientes, incluindo seis pacientes com trombocitopenia associada ao HCV, foram encontradas alterações imunológicas diversas como crioglobulinemia, anticorpos antinucleares e fator reumatóide (Ramos-Casals et al., 2003). De forma similar, encontramos na série de casos aqui

estudados, alterações imunológicas como crioglobulinemia, anticorpos antinucleares, fator reumatóide e anticorpos anticardiolipina.

A escolha da melhor opção terapêutica para pacientes que apresentam trombocitopenia auto-imune associada ao HCV permanece como desafio. Estudos prévios demonstraram apenas resposta plaquetária parcial e transitória ou resposta plaquetária completa e de duração variável após tratamento convencional para PTI (Bauduer et al., 1998; Hernández et al., 1998; Pockros et al., 2002). Em comum com esses estudos, observamos resposta plaquetária variável nos pacientes tratados com corticosteróides e/ou imunoglobulina intravenosa: um paciente (caso 1) não apresentou resposta plaquetária, enquanto que outro paciente (caso 10) apresentou resposta parcial. Também verificamos resposta plaquetária em três pacientes tratados com imunoglobulina anti-D, dos quais dois apresentaram resposta (parcial) plaquetária.

Por outro lado, embora o tratamento antiviral esteja associado ao desenvolvimento de vários efeitos colaterais, incluindo alterações imunológicas e hematológicas (Russo e Fried, 2003), alguns estudos demonstraram que a monoterapia com interferon alfa ou a combinação interferon alfa e ribavirina pode ser opção terapêutica para esses pacientes. Em geral, a resposta plaquetária é variável, embora alguns casos com resposta duradoura (acima de um ano) tenham sido relatados (García-Suárez et al., 2000; Uygun et al., 2000; Rajan e Liebman, 2001; Benci et al., 2003). Iga et al. (2005) observaram aumento significativo da contagem de plaquetas em pacientes com hepatite C crônica (entre trombocitopênicos e não-trombocitopênicos) que apresentaram resposta virológica seis meses após tratamento com interferon alfa durante seis meses. No presente estudo, registramos resposta plaquetária completa em dois pacientes tratados com associação interferon peguilado e ribavirina (casos 2 e 6), indicando que o tratamento antiviral não constitui contraindicação absoluta em pacientes com trombocitopenia associada ao HCV, incluindo casos de natureza autoimune.

Dessa forma, uma investigação rigorosa com relação aos mecanismos patogênicos da trombocitopenia deve ser realizada em todos os pacientes com trombocitopenia associada ao HCV, uma vez que a abordagem terapêutica pode diferir entre os casos. Devemos ressaltar que a melhor conduta terapêutica ainda

está por ser definida em ensaios clínicos mais apropriados, antes que recomendações terapêuticas baseadas em consensos sejam utilizadas na prática clínica.

8 CONCLUSÕES GERAIS

- a) A detecção de HCV-RNA em plaquetas sugere que as mesmas podem constituir reservatórios extra-hepáticos do HCV. A taxa de detecção de HCV-RNA significativamente maior em plaquetas de pacientes trombocitopênicos, bem como a maior frequência do desenvolvimento de trombocitopenia em pacientes HCV-RNA positivos nas plaquetas em relação aos que eram HCV-RNA negativos nas plaquetas, sugerem associação patogênica entre detecção do HCV-RNA nas plaquetas e trombocitopenia, em pelo menos cerca de 60% dos casos estudados;
- b) Os genótipos do HCV mais prevalentes em pacientes com trombocitopenia associada ao HCV foram 1b (53%) e 1a (35%). A trombocitopenia associada ao HCV parece não constituir manifestação extra-hepática genótipo-dependente;
- c) A interação do HCV com plaquetas parece estar relacionada a fatores independentes do sexo, idade, transaminases, estágio de fibrose hepática e genótipo. Com relação à carga viral sérica, a ausência de associação entre seus valores e a taxa de detecção qualitativa no HCV-RNA em plaquetas sugere, provavelmente, que a interação do HCV às mesmas pode não estar relacionada à adsorção inespecífica na sua superfície;
- d) A detecção qualitativa de HCV-RNA em plaquetas antes do tratamento antiviral parece não ter valor preditivo para resposta terapêutica. A não detecção do HCV-RNA em plaquetas ao final do tratamento antiviral foi um fator relacionado à RVS, ao passo que sua presença em plaquetas de pacientes com HCV-RNA não detectado no soro (detecção oculta) foi associada a um maior risco de recidiva da infecção viral no soro;

- e) As principais características clínicas e laboratoriais da série de casos de pacientes com trombocitopenia autoimune associada ao HCV ($n=10$), nos quais nenhum outro mecanismo patogénico da trombocitopenia pôde ser demonstrado, foram: presença de outras alterações imunológicas circulantes, títulos elevados de anticorpos antiplaquetários e resposta plaquetária após tratamento convencional para PTI, sugerindo que mecanismo de natureza autoimune pode desempenhar papel patogénico em uma proporção de casos de trombocitopenia associada ao HCV.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aach RD, Stevens CE, Hollinger FB, Mosley JW, Peterson DA, Taylor PE, et al. Hepatitis C virus infection in post-transfusion hepatitis. *N Eng J Med* 1991;325(19):1325-9.

Abe K, Kurata T, Shikata T. Non-A, non-B hepatitis: visualization of virus-like particles from chimpanzee and human sera. *Arch Virol* 1989;104(3-4):351-5.

Ackerman Z, Paltiel O, Glikberg F, Ackerman E. Hepatitis C virus in various human body fluids: a systematic review. *Hepatol Res* 1998;11(1):26-40.

Adinolfi LE, Giordano MG, Andreana A, Tripodi MF, Utili R, Cesaro G, et al. Hepatic fibrosis plays a central role in the pathogenesis of thrombocytopenia in patients with chronic viral hepatitis. *Br J Haematol* 2001;113(3):590-5.

Afdhal NH, McHutchison JG. Review article: pharmacological approaches for the treatment of thrombocytopenia in patients with chronic liver disease and hepatitis C infection. *Aliment Pharmacol Ther* 2007;26 Suppl 1:29-39.

Afdhal N, McHutchison J, Brown R, Jacobson I, Manns M, Poordad F, et al. Thrombocytopenia associated with chronic liver disease. *J Hepatol* 2008;48(6):1000-7.

Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Brasil). Portaria nº. 1376, de 19 de novembro de 1993. Aprova alterações na Portaria nº 721/GM, de 09.08.89, que aprova normas técnicas para coleta, processamento e transfusão de sangue, componentes e hemoderivados, e dá outras providências. *Diário Oficial da União* 02 dez 1993;Seção 1.

Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Brasil). Portaria nº 262, de 5 de fevereiro de 2002. Torna obrigatório, no âmbito da Hemorrede Nacional a inclusão nos Serviços de Hemoterapia públicos, filantrópicos e/ou privados contratados pelo SUS, e privados, os testes de amplificação e detecção de ácidos nucleicos – NAT, para HIV e HCV, em todas as amostras de sangue de doadores. *Diário Oficial da União* 03 fev 2003;Seção 1.

Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Brasil). Portaria nº. 1407, de 1 de agosto de 2002. Determina a inclusão, no âmbito da Hemorrede Nacional, nos Serviços de Hemoterapia públicos, filantrópicos e/ou privados contratados pelo SUS, e exclusivamente privados, a realização dos testes para detecção de ácidos nucleicos – NAT, para HIV e HCV, em todas as amostras de sangue de doadores. *Diário Oficial da União* 02 ago 2002;Seção 1.

Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Brasil). Portaria nº 79, de 31 de janeiro de 2003. Determina implantação, no âmbito da Hemorrede Nacional, nos Serviços de Hemoterapia públicos, filantrópicos, privados contratados pelo SUS, e

exclusivamente privados, da realização dos testes de amplificação e de detecção de ácidos nucleicos (NAT), para HIV e para HCV, nas amostras de sangue de doadores. Diário Oficial da União 03 fev 2003;Seção1.

Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Brasil). Portaria nº 112, de 29 de janeiro de 2004. Dispõe sobre a implantação, no âmbito da Hemorrede Nacional, da realização dos testes de amplificação e detecção de ácidos nucleicos (NAT), para HIV e HCV. Diário Oficial da União 30 jan 2003;Seção 1.

Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Brasil). Portaria nº 79, de 31 de janeiro de 2003. Institui o Grupo Técnico – GT para estabelecimento de critérios necessários á obtenção de autorização temporária para realização de testes NAT não comerciais para HIV e HCV por Serviços de Hemoterapia. Diário Oficial da União 01 jul 2004;Seção 1.

Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Brasil). Portaria nº 34, de 28 de setembro de 2004. Dispõe sobre protocolo clínico e diretrizes terapêuticas para hepatite viral C. Diário Oficial da União 09 out 2007;Seção 1.

Agnello V, Abel G, Elfahal M, Knight GB, Zhang QX. Hepatitis C virus and other flaviviridae viruses enter cells via low density lipoprotein receptor. Proc Natl Acad Sci USA 1999;96(22):12766-71.

Agnello V, Ábel G, Knight GB, Monteverde A, Ballare M, Bertoncelli MC, et al. Detection of hepatitis C virus (HCV) in liver, bone marrow, and lymph nodes in type II mixed cryoglobulinemia (MC) using in situ hybridization [abstract C163]. Fifth International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses; 1995 Aug. 28–Sept. 3; Gold Coast, Australia.

Agnello V, De Rosa FG. Extrahepatic disease manifestations of HCV infection: some current issues. J Hepatol 2004;40(2):341-52.

Allen JG, Sayman WA. Serum hepatitis from transfusions of blood: epidemiologic study. JAMA 1962;180:1079-85.

Almeida AL, Magalhães MC, De Almeida AJ, Mendes MJ, Stolerman M, Brandão CE, et al. Manifestações hematológicas periféricas da infecção pelo vírus da hepatite C (HCV) [resumo]. Bol Soc Bras Hematol Hemoter 1998;20(Supl):50.

Alter HJ. An unexpected link between HCV and platelets. Blood 2001;98(8):2291.

Alter HJ, Holland PV, Morrow AG, Purcell RH, Feinstone SM, Moritsugu Y. Clinical and serological analysis of transfusion-associated hepatitis. Lancet 1975a;2(7940):838-41.

Alter HJ, Holland PV, Purcell RH, Lander JJ, Feinstone SM, Morrow AG, et al. Posttransfusion hepatitis after exclusion of commercial and hepatitis-B antigen-positive donors. Ann Intern Med 1972;77(5):691-9.

Alter HJ, Holland PV, Purcell RH. The emerging pattern of post-transfusion hepatitis. Am J Med Sci 1975b;270(2):329-34.

Alter HJ, Purcell RH, Holland PV, Popper H. Transmissible agent in non-A, non-B hepatitis. *Lancet* 1978;1(8062):459-63.

Alter HJ, Purcell RH, Shih JW, Melpolder JC, Houghton M, Choo QL, et al. Detection of antibody to hepatitis C virus in prospectively followed transfusion recipients with acute and chronic non-A, non-B hepatitis. *N Eng J Med* 1989;321(22):1494-500.

Alter MJ, Margolis HS, Krawczynski K, Judson FN, Mares A, Alexander WJ, et al. The natural history of community-acquired hepatitis C in the United States. The Sentinel Counties Chronic non-A, non-B Hepatitis Study Team. *N Engl J Med* 1992;327(27):1899-905.

Alter MJ, Mast EE, Moyer LA, Margolis HS. Hepatitis C. *Infect Dis Clin North Am* 1998;12(1):13-26.

Amorim RM, Oliveira CP, Wyant PS, Cerqueira DM, Câmara GN, Flores LS, et al. Hepatitis C virus genotypes in blood donors from the Federal District, Central Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2004;99(8):895-7.

Andrade AF, Oliveira-Silva M, Silva SG, Motta IJ, Bonvicino CR. Seroprevalence of hepatitis B and C virus markers among blood donors in Rio de Janeiro, Brazil, 1998-2005. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2006;101(6):673-6.

Anônimo. Treatment of hepatitis C. Wednesday 27 and Thursday 28 February 2002 Maison de la Chimie, Paris, France. *Acta Gastroenterol Belg* 2002;65(2):120-30.

Ansaldi F, Torre F, Bruzzone BM, Picciotto A, Crovari P, Icardi G. Evaluation of a new hepatitis C virus sequencing assay as a routine method for genotyping. *J Med Virol* 2001;63(1):17-21.

Ascione A, Tartaglione T, Giuseppe Di Costanzo G. Natural history of chronic hepatitis C virus infection. *Dig Liver Dis* 2007;39 Suppl 1:S4-7.

Aster RH, Bougie DW. Drug-induced immune thrombocytopenia. *N Engl J Med* 2007;357(6):580-7.

Aster RH. Pooling of platelets in the spleen: role in the pathogenesis of "hypersplenic" thrombocytopenia. *J Clin Invest* 1966;45(5):645-57.

Bain VG, Bonacini M, Govindarajan S, Ma M, Sherman M, Gibas A, et al. A multicenter study of the usefulness of liver biopsy in hepatitis C. *J Viral Hepat* 2004;11(4):375-82.

Bartenschlager R, Lohmann V. Replication of hepatitis C virus. *J Gen Virol* 2000;81(Pt 7):1631-48.

Barth H, Liang TJ, Baumert TF. Hepatitis C virus entry: molecular biology and clinical implications. *Hepatology* 2006;44(3):527-35.

Barth H, Schnober EK, Neumann-Haefelin C, Thumann C, Zeisel MB, Diepolder HM, et al. Scavenger receptor class B is required for hepatitis C virus uptake and cross-presentation by human dendritic cells. *J Virol* 2008;82(7):3466-79.

- Bartosch B, Cosset FL. Cell entry of hepatitis C virus. *Virology* 2006;348(1):1-12.
- Bassit L, Da Silva LC, Ribeiro-dos-Santos G, Maertens G, Carrilho FL, Fonseca LEP, et al. Chronic hepatitis C virus infections in Brazilian patients: association with genotypes, clinical parameters and response to long term alpha interferon therapy. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 1999a;41(3):183-9.
- Bassit L, Ribeiro-dos-Santos G, da Silva LC, Takei K, Villaça P, David-Neto E, et al. Genotype distribution of hepatitis C virus in São Paulo, Brazil: rare subtype found. *Hepatology* 1999b;29(3):994-5.
- Bauduer F, Marty F, Larrouy M, Ducout L. Immunologic thrombocytopenic purpura as presenting symptom of hepatitis C infection. *Am J Hematol* 1998;57(4):338-40.
- Beardsley DS. ITP in the 21st Century. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2006;402-7.
- Bedossa P, Poynard T. The METAVIR Cooperative Study Group. An algorithm for the grading of activity in chronic hepatitis C. *Hepatology* 1996;24(2):289-93.
- Benci A, Caremani M, Tacconi D. Thrombocytopenia in patients with HCV-positive chronic hepatitis: efficacy of leucocyte interferon-alpha treatment. *Int J Clin Pract* 2003;57(1):17-9.
- Bhattacharjee V, Prescott LE, Pike I, Rodgers B, Bell H, El-Zayadi AR, et al. Use of NS-4 peptides to identify type-specific antibody to hepatitis C virus genotypes 1, 2, 3, 4, 5 and 6. *J Gen Virol* 1995;76(Pt 7):1737-48.
- Bonkovsky HL, Mehta S. Hepatitis C: a review and update. *J Am Acad Dermatol* 2001;44(2):159-79.
- Booth JC, O'Grady J, Neuberger J; The Royal College of Physicians of London and the British Society of Gastroenterology. Clinical guidelines on the management of hepatitis C. *Gut* 2001;49(Suppl 1):11-21.
- Bordin G, Ballaré M, Zigrossi P, Bertonecelli MC, Paccagnino L, Baroli A, et al. A laboratory and thrombokinetic study of HCV-associated thrombocytopenia: a direct role of HCV in bone marrow exhaustion? *Clin Exp Rheumatol* 1995;13(Suppl 13):S39-43.
- Bouchardeau F, Cantaloube JF, Chevaliez S, Portal C, Razer A, Lefrère JJ, et al. Improvement of hepatitis C virus (HCV) genotype determination with the new version of the INNO-LiPA HCV assay. *J Clin Microbiol* 2007;45(4):1140-5.
- Boyer N, Marcellin P. Pathogenesis, diagnosis and management of hepatitis C. *J Hepatol* 2000;32(1 Suppl):98-112.
- Bradley DW, Cook EH, Maynard JE, McCaustland KA, Ebert JW, Dolana GH, et al. Experimental infection of chimpanzees with antihemophilic (factor VIII) materials: recovery of virus-like particles associated with non-A, non-B hepatitis. *J Med Virol* 1979;3(4):253-69.

Bradley DW, Maynard JE, Cook EH, Ebert JW, Gravelle CR, Tsiquaye KN, et al. Non-A/non-B hepatitis in experimentally infected chimpanzees: cross-challenge and electron microscopic studies. *J Med Virol* 1980;6(3):185-201.

Bradley DW, Maynard JE, Popper H, Ebert JW, Cook EH, Fields HA, et al. Persistent non-A, non-B hepatitis in experimentally infected chimpanzees. *J Infect Dis* 1981;143(2):210-8.

Bradley DW, McCaustland KA, Cook EH, Schable CA, Ebert JW, Maynard JE. Posttransfusion non-A, non-B hepatitis in chimpanzees. Physicochemical evidence that the tubule-forming agent is a small, enveloped virus. *Gastroenterology* 1985a;88(3):773-9.

Bradley DW. The agents of non-A, non-B viral hepatitis. *J Viral Methods* 1985b;10(4):307-19.

Branch AD, Stump DD, Gutierrez JA, Eng F, Walewski JL. The hepatitis C virus alternate reading frame (ARF) and its family of novel products: the alternate reading frame protein/F-protein, the double-frameshift protein, and others. *Semin Liver Dis* 2005;25(1):105-17.

Brass V, Moradpour D, Blum HE. Molecular virology of hepatitis C virus (HCV): 2006 update. *Int J Med Sci* 2006;3(2):29-34.

Br  chot C. Hepatitis C virus: molecular biology and genetic variability. *Dig Dis Sci* 1996;41(12 Suppl):6S-21S.

Bukh J, Emerson SU, Purcell RH. Genetic heterogeneity of hepatitis C virus and related viruses. In: Rizzetto M, Purcell RH, Gerin JL, Verme G. **Viral hepatitis and liver disease**. Turin: Minerva M  dica; 1997. p. 167-75.

Bukh J, Miller RH, Purcell RH. Genetic heterogeneity of hepatitis C virus: quasispecies and genotypes. *Semin Liver Dis* 1995;15(1):41-63.

Bukh J, Purcell RH, Miller RH. Sequence analysis of the 5' noncoding region of hepatitis C virus. *Proc Natl Acad USA* 1992;89(11):4942-6.

Buoro S, Pizzighella S, Boschetto R, Pellizzari L, Cusan M, Bonaguro R, et al. Typing of hepatitis C virus by a new method based on restriction fragment length polymorphisms. *Intervirology* 1999;42(1):1-8.

Cacoub P, Poynard T, Ghillani P, Charlotte F, Olivi M, Piette JC, et al. Extrahepatic manifestations of chronic hepatitis C. MULTIVIRC Group. Multidepartment Virus C. *Arthritis Rheum*. 1999;42(10):2204-12.

Cacoub P, Renou C, Rosenthal E, Cohen P, Loury I, Loustaud-Ratti V, et al. Extrahepatic manifestations associated with hepatitis C virus infection : a prospective multicenter study of 321 patients. The GERMIVIC. Groupe d'Etude et de Recherche em Medecine Interne et Maladies Infectieuses sur le Virus de l'hepatite C. *Medicine (Baltimore)* 2000;79(1):47-56.

Campiotto S, Pinho JRR, Carrilho FJ, Da Silva LC, Souto FJD, Spinelli V, et al. Geographic distribution of hepatitis C virus genotypes in Brasil. *Braz J Med Biol Res* 2005;38(1):41-49.

Campuzano-Maya G. Proof of an association between *Helicobacter pylori* and idiopathic thrombocytopenic purpura in Latin America. *Helicobacter* 2007;12(3):265-73.

Carmo RA, Oliveira GC, Guimarães MDC, Oliveira MS, Lima AA, Buzek SC, et al. Hepatitis C virus infection among Brazilian hemophiliacs: a virological, clinical and epidemiological study. *Braz J Med Biol Res* 2002;35(5):589-98.

Carneiro MA, Teles SA, Dias MA, Ferreira RC, Naghettine AV, Silva SA, et al. Decline of hepatitis C infection in hemodialysis patients in Central Brazil: a ten years of surveillance. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2005;100(4):345-9.

Carreño V. Occult hepatitis C virus infection: a new form of hepatitis C. *World J Gastroenterol* 2006;12(43):6922-5.

Castillo I, Pardo M, Bartolomé J, Ortiz-Movilla N, Rodríguez-Iñigo E, de Lucas S, et al. Occult hepatitis C virus infection in patients in whom the etiology of persistently abnormal results of liver-function tests is unknown. *J Infect Dis* 2004;189(1):7-14.

Cavalheiro N P. Sexual transmission of hepatitis C. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 2007;49(5):271-7.

Cheney CP, Graham C. Hepatitis C. *Infect Dis Clin North Am* 2000;14(3):633-67.

Chen SL, Morgan TR. The natural history of hepatitis C virus (HCV) infection. *Int J Med Sci* 2006;3(2):47-52.

Chevaliez S, Pawlotsky JM. Hepatitis C virus serologic and virologic tests and clinical diagnosis of HCV-related liver disease. *Int J Med Sci* 2006;3(2):35-40.

Chevaliez S, Pawlotsky JM. Hepatitis C virus: Virology, diagnosis and management of antiviral therapy. *World J Gastroenterol* 2007;13(17):2461-6.

Choo QL, Kuo G, Weiner AJ, Overby LR, Bradley DW, Houghton M. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science* 1989;244(4902):359-62.

Choo QL, Richman KH, Han JH, Berger K, Lee C, Dong C, et al. Genetic organization and diversity of the hepatitis C virus. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88(6):2451-5.

Choo QL, Weiner AJ, Overby LR, Kuo G, Houghton M, Bradley DW. Hepatitis C virus: the major causative agent of viral non-A, non-B hepatitis. *Br Med Bull* 1990;46(2):423-41.

Christensen C, Bruden D, Livingston S, Deubner H, Homan C, Smith K, et al. Diagnostic accuracy of a fibrosis serum panel (FIBROSpect II) compared with

Knodell and Ishak liver biopsy scores in chronic hepatitis C patients. *J Viral Hepat* 2006;13(10):652-8.

Ciorlia LAS, Zanetta DMT. Hepatite C em profissionais da saúde: prevalência e associação com fatores de risco. *Rev Saúde Pública* 2007;41(2):229-35.

Cocquerel L, Voisset C, Dubuisson J. Hepatitis C virus entry: potential receptors and their biological functions. *J Gen Virol* 2006;87(Pt 5):1075-84.

Code L, de Freitas LAR, Santos-Jesus R, Vitvitski L, Silva LK, Trepo C, et al. Comparative study of hepatitis C virus genotypes 1 and 3 in Salvador, Bahia. *Braz J Infect Dis* 2003;7(6):409-17.

Colombo M. The natural history of hepatitis C. *Baillière's Clin Gastroenterol* 1996;10(2):275-88.

Cooper N, Bussel J. The pathogenesis of immune thrombocytopenic purpura. *Br J Haematol* 2006;133(4):364-74.

Cossart YE. Broadsheet. Number 49: Laboratory investigation of hepatitis C: a review. *Pathology* 1999;31(2):102-8.

Costa MA, Schiff ER. Hepatitis C. *Curr Treat Options Gastroenterol* 1999;2(6):481-9.

Couroucé AM, Le Marrec N, Bouchardeau F, Razer A, Maniez M, Laperche S, et al. Efficacy of HCV core antigen detection during the preseroconversion period. *Transfusion* 2000;40(10):1198-1202.

Craxì A, Laffi G, Zignego AL. Hepatitis C virus (HCV): A systematic review. *Mol Aspects Med* 2008;29(1-2):85-95.

Croom HA, Richards KM, Best SJ, Francis BH, Johnson EI, Dax EM, et al. Commercial enzyme immunoassay adapted for the detection of antibodies to hepatitis C virus in dried blood spots. *J Clin Virol* 2006;36(1):68-71.

Crovatto M, Pozzato G, Zorat F, Pussini E, Nascimben F, Baracetti S, et al. Peripheral blood neutrophils from hepatitis C virus-infected patients are replication sites of the virus. *Haematologica* 2000;85(4):356-61.

Curry MP, Afdhal NH. Use of growth factors with antiviral therapy for chronic hepatitis C. *Clin Liver Dis* 2005;9(3):439-51.

Czaja AJ. Extrahepatic immunologic features of chronic viral hepatitis. *Dig Dis* 1997;15(3):125-44.

Dal Molin G, D'Agaro P, Ansaldi F, Ciana G, Fertz C, Alberico S, et al. Mother-to-infant transmission of hepatitis C virus: rate of infection and assessment of viral load and IgM anti-HCV as risk factors. *J Med Virol* 2002;67(2):137-42.

Davidson F, Simmonds P, Ferguson JC, Jarvis LM, Dow BC, Follett EAC, et al. Survey of major genotypes and subtypes of hepatitis C virus using RFLP of

sequences amplified from the 5' non-coding region. *J Gen Virol* 1995;76(Pt 5):1197-204.

De Almeida AJ, Campos-de-Magalhães M, Brandão-Mello CE, de Oliveira RV, Yoshida CF, Lampe E. Detection of hepatitis C virus in platelets: evaluating its relationship to viral and host factors. *Hepatogastroenterology* 2007;54(75):964-8.

De Almeida AJ, Campos-de-Magalhães M, Brandão-Mello CE, de Oliveira RV, do Espírito-Santo MP, Yoshida CF, et al. Detection of hepatitis C virus in platelets: evaluating its relationship to antiviral therapy outcome. *Hepatogastroenterology* 2008 (no prelo).

De Almeida AJ, Campos-de-Magalhães M, de Melo Marçal OP, Brandão-Mello CE, Okawa MY, de Oliveira RV, et al. Hepatitis C virus-associated thrombocytopenia: a controlled prospective, virological study. *Ann Hematol* 2004;83(7):434-40.

De Botton S, Sabri S, Daugas E, Zermati Y, Guidotti JE, Hermine O, et al. Platelet formation is a consequence of caspase activation within megakaryocytes. *Blood* 2002;100(4):1310-7.

De Groote J, Desmet VJ, Gedigk P, Korb G, Popper H, Poulsen H, et al. A classification of chronic hepatitis. *Lancet* 1968;2(7568):626-8.

De Mattia D, Del Principe D, Del Velcchio GC, Jankovic M, Arrighini A, Giordano P, et al. Acute childhood idiopathic thrombocytopenic purpura: AIEOP consensus guidelines for diagnosis and treatment. *Haematologica* 2000;85(4):420-4.

De P, Roy É, Boivin JF, Cox J, Morissette C. Risk of hepatitis C virus transmission through drug preparation equipment: a systematic and methodological review. *J Viral Hepat* 2008;15(4):279-92.

Desmet VJ, Gerber M, Hoofnagle JH, Manns M, Scheuer PJ. Classification of chronic hepatitis: diagnosis, grading and staging. *Hepatology* 1994;19(6):1513-20.

Deuffic-Burban S, Poynard T, Valleron AJ. Quantification of fibrosis progression in patients with chronic hepatitis C using a Markov model. *J Viral Hepat* 2002;9(2):114-22.

Di Bisceglie AM. Hepatitis C. *Lancet* 1998;351(9099):351-5.

Dickson RC. Clinical manifestations of hepatitis C. *Clin Liver Dis* 1997;1(3):569-85.

Diedrich G. How does hepatitis C virus enter cells? *FEBS J* 2006;273(17):3871-85.

Dienstag JL. Non-A, non-B hepatitis. I. Recognition, epidemiology, and clinical features. *Gastroenterology* 1983a;85(2):439-62.

Dienstag JL. Non-A, non-B hepatitis. II. Experimental transmission, putative virus agent and markers, and prevention. *Gastroenterology* 1983b;85(3):743-68.

Dieterich DT, Spivak JL. Hematologic disorders associated with hepatitis C virus infection and their management. *Clin Infect Dis* 2003;37(4):533-41.

Di Liberto G, Roque-Afonso AM, Kara R, Ducoulombier D, Fallot G, Samuel D, et al. Clinical and therapeutic implications of hepatitis C virus compartmentalization. *Gastroenterology* 2006;131(1):76-84.

Doi T, Homma H, Mezawa S, Kato J, Kogawa K, Sakamaki S, et al. Mechanisms for increment of platelet associated IgG and platelet surface IgG and their implications in immune thrombocytopenia associated with chronic viral liver disease. *Hepatol Res* 2002;24(1):23-33.

Drazan KE. Molecular biology of hepatitis C infection. *Liver Transpl* 2000;6(4):396-406.

Drummer HE, Boo I, Maerz AL, Pountourios P. A conserved gly436-trp-leu-ala-gly-leu-phe-tyr motif in hepatitis C virus glycoprotein E2 is a determinant of CD81 binding and viral entry. *J Virol* 2006;80(16):7844-53.

Drummer HE, Wilson KA, Pountourios P. Identification of the hepatitis C virus E2 glycoprotein binding site on the large extracellular loop of CD81. *J Virol* 2002;76(21):11143-7.

Ducoulombier D, Roque-Afonso AM, Di Liberto G, Penin F, Kara R, Richard Y, et al. Frequent compartmentalization of hepatitis C virus variants in circulating B cells and monocytes. *Hepatology* 2004;39(3):817-25.

Durand JM, Cretel E, Retornaz F, Lefevre P, Kaplanski G, Soubeyrand J. Alpha interferon therapy in thrombocytopenia associated with hepatitis C virus infection. *J Hepatol* 1994;21(2):277-9.

Durand JM, Lefevre P, Telle H, Kaplanski G, Quiles N, Soubeyrand J. Thrombocytopenic purpura and hepatitis C infection. *Haematologica* 1993;78(2):135.

Enomoto N, Sakuma I, Asahina Y, Kurosaki M, Murakami T, Yamamoto C, et al. Comparison of full-length sequences of interferon-sensitive and resistant hepatitis C virus 1b. Sensitivity to interferon is conferred with amino acid and substitutions in the NS5A gene. *J Clin Invest* 1995;96(1):224-30.

Enomoto N, Sakuma I, Asahina Y, Kurosaki M, Murakami T, Yamamoto C, et al. Mutations in the nonstructural protein 5A gene and response to interferon in patients with chronic hepatitis C virus 1b infection. *N Engl J Med* 1996;334(2):77-81.

Erensoy S. Diagnosis of hepatitis C virus (HCV) infection and laboratory monitoring of its therapy. *J Clin Virol* 2001;21(3):271-81.

European Association for the Study of the Liver. EASL International Consensus Conference on Hepatitis C. Paris, 26-28, February 1999, Consensus Statement. *J Hepatol* 1999;30(5):956-961.

Evans MJ, von Hahn T, Tscherne DM, Syder AJ, Panis M, Wölk B, et al. Claudin-1 is a hepatitis C virus co-receptor required for a late step in entry. *Nature* 2007;446(7137):801-5.

Fabris F, Salvan F, Silla R, Lazzaro AR, Cordiano I, Girolami A, et al. Anti-hepatitis C virus serology in immune thrombocytopenic: a retrospective analysis in 101 patients. *Hematology* 1998;3:251-6.

Fan W, Zhu W, Wei L, Wang Q, Yin L, Du S, et al. Nonstructural 5A gene variability of hepatitis C virus (HCV) during a 10-year follow up. *J Gastroenterol* 2005;40(1):43-51.

Farci P, Alter HJ, Shimoda A, Govindarajan S, Cheung LC, Melpolder JC, et al. Hepatitis C virus-associated fulminant hepatic failure. *N Engl J Med* 1996;335(9):631-4.

Fauquet CM, Fargette D. International Committee on Taxonomy of Viruses and the 3,142 unassigned species. *Virology* 2005;2:64

Favre D, Muellhaupt B. Potential cellular receptors involved in hepatitis C virus entry into cells. *Lipids Health Dis* 2005;4(1):9.

Feinstone SM, Zapikian AZ, Purcell RH, Alter HJ, Holland PV. Transfusion-associated hepatitis not due to viral hepatitis type A or B. *N Engl J Med* 1975;292(15):767-70.

Feinstone SM, Mihalik KB, Kamimura T, Alter HJ, London WT, Purcell RH. Inactivation of hepatitis B virus and non-A, non-B hepatitis by chloroform. *Infect Immun* 1983;41(2):816-21.

Ferrenci P. Predictors of response to therapy for chronic hepatitis C. *Semin Liver Dis* 2004;24 Suppl 2:25-31.

Ferri C, Antonelli A, Mascia MT, Sebastiani M, Fallahi P, Ferrari D, et al. HCV-related autoimmune and neoplastic disorders: the HCV syndrome. *Dig Liver Dis* 2007;39(Suppl 1):S13-21.

Ferri C, Caracciolo F, Zignego AL, La Civita L, Monti M, Longombardo G, et al. Hepatitis C virus infection in patients with non-Hodgkin's lymphoma. *Br J Haematol* 1994;88(2):392-4.

Flint M, von Hahn T, Zhang J, Farquhar M, Jones CT, Balfe P, et al. Diverse CD81 proteins support hepatitis C virus infection. *J Virol* 2007;80(22):11331-42.

Floreani A, Biasin MR, Marchelle G, Graziotto A, Chiaramonte M, Infantolino D. Are human platelets a site of HCV replication? [abstract] *Hepatology* 1996;24(4 Pt 2):511A.

Focaccia R, Baraldo DC, Ferraz ML, Martinelli AL, Carrilho FJ, Gonçalves FL Jr, et al. Demographic and anthropometrical analysis and genotype distribution of chronic hepatitis C patients treated in public and private reference centers in Brazil. *Braz J Infect Dis* 2004;8(5):348-55.

Fonseca JCF. Epidemiologia da infecção pelo vírus da hepatite C no Brasil. Relatório do Grupo de Estudo da Sociedade Brasileira de Hepatologia. *GED Gastroenterol Endosc Dig* 1999;18(Supl 1):S3-8.

Forns X, Ampurdanes S, Llovet JM, Aponte J, Quinto L, Martinez-Bauer E, et al. Identification of chronic hepatitis C patients without hepatic fibrosis by a simple predictive model. *Hepatology* 2002;36(4 Pt 1):986-92.

Forns X, Bukh J. The molecular biology of hepatitis C virus. Genotypes and quasispecies. *Clin Liver Dis* 1999;3(4):693-716.

Forns X, Costa J. HCV virological assessment. *J Hepatol* 2006;44 Suppl 1:S35-9.

Frank C, Mohamed MK, Strickland GT, Lavanchy D, Arthur RR, Magder LS, et al. The role of parenteral antischistosomal therapy in the spread of hepatitis C virus in Egypt. *Lancet* 2000;355(9207):887-91.

Friebe P, Bartenschlager R. Genetic analysis of sequences in the 3' nontranslated region of hepatitis C virus that are important for RNA replication. *J Virol* 2002;76(11):5326-38.

Galossi A, Guarisco R, Bellis L, Puoti C. Extrahepatic manifestations of Chronic HCV infection. *J Gastrointestin Liver Dis* 2007;16(1):65-73.

García-Carrasco M, Escárcega RO. Extrahepatic autoimmune manifestation of chronic hepatitis C virus infection. *Ann Hepatol* 2006;5(3):161-3.

García-Suárez J, Burgaleta C, Hernanz N, Albarran F, Tobaruela P, Alvarez-Mon M. HCV-associated thrombocytopenia: clinical characteristics and platelet response after recombinant $\alpha 2b$ -interferon therapy. *Br J Haematol* 2000;110(1):98-103.

Gayotto LCC; Comitê SBP/SBH. Visão histórica e consenso nacional sobre a classificação das hepatites crônicas. *GED Gastroenterol Endosc Dig* 2000;19(3):137-40.

Geddis AE, Kaushansky K. Immunology. The root of platelet production. *Science* 2007;317(5845):1689-91.

George JN. Platelets. *Lancet* 2000;355(9214):1531-9.

George JN, Raskob GE, Shah SR, Rizvi MA, Hamilton SA, Osborne S, et al. Drug-induced thrombocytopenia: a systematic review of published case reports. *Ann Intern Med* 1998;129(11):886-90.

George JN, Rizvi MA. Thrombocytopenia. In: Beutler E, Lichtman MA, Coller B, Kipps TJ, Seligsohn U. **Williams Hematology**. 6th ed. New York: McGraw-Hill; 2001. p. 1495-1539.

George JN, Woolf SH, Raskob GE, Wasser JS, Aledort LM, Ballem PJ, et al. Idiopathic thrombocytopenic purpura: a practice guideline developed by explicit methods for the American Society of Hematology. *Blood* 1996;88(1):3-40.

Gerber MA. Pathobiologic effects of hepatitis C. *J Hepatol* 1995;22(1 Suppl):83-6.

Gerli GC, Carraro MC, Siboni SM, Fantini NN, Bruno S, Gaggetta M, et al. Thrombocytopenia in HCV positive subjects. *Haematologica* June;84(EHA-4 Abstract Book):189.

Germer JJ, Rys PN, Thorvilson JN, Persing DH. Determination of hepatitis C virus genotype by direct sequence analysis of products generated with the Amplicor HCV test. *J Clin Microbiol* 1999;37(8):2625-30.

Giannini E, Borro P, Botta F, Fumagalli A, Malfatti F, Podestà E, et al. Serum thrombopoietin levels are linked to liver function in untreated patients with hepatitis C virus-related chronic hepatitis. *J Hepatol* 2002;37(5):572-7.

Giannini EG, Savarino V. Thrombocytopenia in liver disease. *Curr Opin Hematol* 2008;15(5):473-80.

Gish RG, Lau JYN. Hepatitis C virus: eight years old. *Viral Hepat Rev* 1997;3(1):17-37.

Gong GZ, Lai LY, Jiang YF, He Y, Su XS. HCV replication in PBMC and its influence on interferon therapy. *World J Gastroenterol* 2003;9(2):291-294.

González-Quintela A, Alende MR, Gamallo R, González-Gil P, López-Bem S, Tomé S, et al. Serum immunoglobulins (IgG, IgA, IgM) in chronic hepatitis C. A comparison with non-cirrhotic alcoholic liver disease. *Hepatogastroenterology* 2003;50(54):2121-6.

Grady GF, Chalmers TC. Risk of post-transfusion viral hepatitis. *N Engl J Med* 1964;271(7):337-42.

Grakoui A, Wychowski C, Lin C, Feinstone SM, Rice CM. Expression and identification of hepatitis C virus polyprotein cleavage products. *J Virol* 1993;67(3):1385-95.

Gretch D. Mechanism of interferon resistance in hepatitis C. *Lancet* 2001;358(9294):1662-4.

Guimarães T, Granato CF, Varella D, Ferraz ML, Castelo A, Kallás EG. High prevalence of hepatitis C infection in a Brazilian prison: identification of risk factors for infection. *Braz J Infect Dis* 2001;5(3):111-8.

Hadziyannis SJ. Nonhepatic manifestations and combined diseases in HCV infection. *Dig Dis Sci* 1996;41(12 Suppl):63S-74S.

Hadziyannis SJ. The spectrum of extrahepatic manifestations in hepatitis C virus infection. *J Viral Hepat* 1997;4(1):9-28.

Halfon P, Trimoulet P, Bourliere M, Khiri H, de Lédighen V, Couzigou P, et al. Hepatitis C virus genotyping based on 5' noncoding sequence analysis (Trugene). *J Clin Microbiol* 2001;39(5):1771-3.

Hamaia S, Li C, Allain JP. The dynamics of hepatitis C virus binding to platelets and 2 mononuclear cell lines. *Blood* 2001;98(8):2293-300.

Hampers CL, Prager D, Senior JR. Post-transfusion anicteric hepatitis. *N Engl J Med* 1964;271(15):747-54.

Han JH, Shyamala V, Richman KH, Brauer MJ, Irvine B, Urdea MS, et al. Characterization of the terminal regions of hepatitis C viral RNA: identification of conserved sequences in the 5' untranslated region and poly (A) tails at the 3' end. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88(5):1711-5.

Harris HJ, Farquhar MJ, Mee CJ, Davis C, Reynolds GM, Jennings A, et al. CD81 and claudin 1 co-receptor association: a role in hepatitis C virus entry. *J Virol* 2008;82(10):5007-20.

Heintges T, Wands JR. Hepatitis C virus: epidemiology and transmission. *Hepatology* 1997;26(3):521-6.

He LF, Alling D, Popkin T, Shapiro M, Alter HJ, Purcell RH. Determining the size of non-A, non-B hepatitis virus by filtration. *J Infect Dis* 1987;156(4):636-40.

Heller T, Rehmann B. Acute hepatitis C: a multifaceted disease. *Semin Liver Dis* 2005;25(1):7-17.

Hernández F, Blanquer A, Linares M, López A, Tarín F, Cerveró A. Autoimmune thrombocytopenia associated with hepatitis C virus infection. *Acta Haematol* 1998;99(4):217-20.

Herrine SK. Approach to the patient with chronic hepatitis C virus infection. *Ann Intern Med* 2002;136(10):747-57.

Herrine SK, Weinberg DS. Epidemiology of hepatitis C viral infection. *Infect Med* 1999;16(2):111-7.

Hilgard P, Treichel U, Dries V, Dienes HP, Gerken G. Cryoglobulin-associated uptake of hepatitis C virus into human hepatocytes. *Hepatogastroenterology* 2005;52(65):1534-40.

Hoofnagle JH. Hepatitis C: the clinical spectrum of disease. *Hepatology* 1997;26(3 Suppl 1):15S-20S.

Holland PV, Alter HJ, Purcell RH, Walsh JJ, Morrow AG, Schmidt PJ. The infectivity of blood containing the Australia antigen. In: Prier JE, Friedman H, editors. **Australia antigen**. Baltimore: University Park Press; 1973. p. 191-203.

Holland PV, Barrera JM, Ercilla MG, Yoshida CF, Wang Y, de Olim GA. Genotyping hepatitis C virus isolates from Spain, Brazil, China, and Macau by a simplified PCR method. *J Clin Microbiol* 1996;34(10):2372-8.

Hollinger FB, Gitnick GL, Aach RD, Szmuness W, Mosley JW, Stevens CE, et al. Non-A, non-B hepatitis transmission in chimpanzees: a project of the transfusion-transmitted viruses study group. *Intervirology* 1978;10(1):60-8.

Hollinger FB, Mosley JW, Szmunes W, Aach RD, Peters RL, Stevens C. Transfusion-transmitted viruses study: experimental evidence for two non-A, non-B hepatitis agents. *J Infect Dis* 1980;142(3):400-7.

Hollinger FB, Dolana G, Thomas W, Gyorkey F. Reduction in risk of hepatitis transmission by heat-treatment of a human factor VIII concentrate. *J Infect Dis* 1984;150(2):250-62.

Houghton M. Hepatitis C viruses. In: Fields BN, Knipe DM, Howley PM, Chanock RM, Melnick JL, Monath TP, et al. **Fields Virology**. 3rd ed. Philadelphia: Lippincott; 1996. p. 1035-58.

Houghton M, Weiner A, Han J, Kuo G, Choo QL. Molecular biology of the hepatitis C viruses: implications for diagnosis, development and control of viral disease. *Hepatology* 1991;14(2):381-8.

Hughes CA, Shafran SD. Chronic hepatitis C virus management: 2000-2005 update. *Ann Pharmacother* 2006;40(1):74-82.

Idilman R, Cetinkaya H, Savas I, Aslan N, Sak SD, Bastemir M, et al. Bronchoalveolar lavage fluid analysis in individuals with chronic hepatitis C. *J Med Virol* 2002;66(1):34-9.

Iga D, Tomimatsu M, Endo H, Ohkawa SI, Yamada O. Improvement of thrombocytopenia with disappearance of HCV RNA in patients treated by interferon-alpha therapy: possible etiology of HCV-associated immune thrombocytopenia. *Eur J Haematol* 2005;75(5):417-423.

Imbert-Bismut F, Ratziu V, Pieroni L, Charlotte F, Benhamou Y, Poynard T; MULTIVIRC Group. Biochemical markers of liver fibrosis in patients with hepatitis C virus infection: a prospective study. *Lancet* 2001;357(9262):1069-75.

Irwing WL, Salmon D, Boucher C, Hoepelman IM. Acute hepatitis C virus infection. *Euro Surveill* 2008;13(21):pii 18879.

Ishak K, Baptista A, Bianchi L, Callea F, De Groote J, Gudat F, et al. Histological grading and staging of chronic hepatitis. *J Hepatol* 1995;22(6):696-9.

Ishida S, Kaito M, Kohara M, Tsukiyama-Kohora K, Fujita N, Ikoma J, et al. Hepatitis C virus core particle detected by immunoelectron microscopy and optical rotation technique. *Hepatol Res* 2001;20(3):335-47.

Italiano JE Jr, Hartwig JH. Megakaryocyte and platelet structure. In: Hoffman R, Benz EJ Jr, Shattil SJ, Furie B, Cohen HJ, Silberstein LE, et al. **Hematology: basic principles and practice**. 4th ed. Philadelphia: Elsevier Churchill Livingstone; 2005. p. 1872-80.

Jandrot-Perrus M, Busfield S, Lagrue AH, Xiong X, Debili N, Chickering T, et al. Cloning, characterization, and functional studies of human and mouse glycoprotein VI: a platelet-specific collagen receptor from the immunoglobulin superfamily. *Blood* 2000;96(5):1798-807.

Januszkiewicz-Lewandowska D, Wysocki J, Pernak M, Nowicka K, Zawada M, Rembowska J, et al. Presence of hepatitis C virus (HCV) in peripheral blood mononuclear cells in HCV serum negative patients during interferon and ribavirin therapy. *Jpn J Infect Dis* 2007;60(1):29-32.

Judd A, Parry J, Hickman M, McDonald T, Jordan L, Lewis K, et al. Evaluation of a modified commercial assay in detecting antibody to hepatitis C virus in oral fluids and dried blood spots. *J Med Virol* 2003;71(1):49-55.

Kaito M, Watanabe S, Tsukiyama-Kohara K, Yamaguchi K, Kobayashi Y, Konishi M, et al. Hepatitis C virus particle detected by immunoelectron microscopic study. *J Gen Virol* 1994;75(Pt 7):1755-60.

Kajihara M, Kato S, Okazaki Y, Kawakami Y, Ishii H, Ikeda Y, et al. A role of autoantibody-mediated platelet destruction in thrombocytopenia in patients with cirrhosis. *Hepatology* 2003;37(6):1267-76.

Kamal SM. Acute hepatitis C: a systematic review. *Am J Gastroenterol* 2008;103(5):1283-97.

Kamal SM. Acute hepatitis C: Prospects and challenges. *World J Gastroenterol* 2007;13(48):6455-7.

Karasu Z, Tekin F, Ersoz G, Gunsar F, Batur Y, Ilter T, et al. Liver fibrosis is associated with decreased peripheral platelet count in patients with chronic hepatitis B and C. *Dig Dis Sci* 2007;52(6):1535-9.

Karmochkine M, Carrat F, Dos Santos O, Cacoub P, Raguin G. A case-control study of risk factors for hepatitis C infection in patients with unexplained routes of infection. *J Viral Hepat* 2006;13(11):775-82.

Kato N. Genome of human hepatitis C virus (HCV): gene organization, sequence diversity, and variation. *Microb Comp Genomics* 2000;5(3):129-51.

Kato N. Molecular virology of hepatitis C virus. *Acta Med Okayama* 2001;55(3):133-59.

Kato T, Matsumoto A, Ogami K, Tahara T, Morita H, Miyazaki H. Native thrombopoietin: structure and function. *Stem Cells* 1998;16 Suppl 2:11-9.

Kaushansky K. Historical review: megakaryopoiesis and thrombopoiesis. *Blood* 2008;111(3):981-6.

Kaushansky K. Lineage-specific hematopoietic growth factors. *N Engl J Med* 2006;354(19):2034-45.

Kaushansky K. Thrombopoietin. *N Engl J Med* 1998;339(11):746-54.

Kipps T. The cluster of differentiation antigens. In: Beutler E, Lichtman MA, Coller B, Kipps TJ, Seligsohn U. **Williams Hematology**. 5th ed. New York: McGraw-Hill; 2001. p. 141-52.

Kleiner DE. The liver biopsy in chronic hepatitis C: a view from the other side of the microscope. *Semin Liver Dis* 2005;25(1):52-64.

Knodell RG, Conrad ME, Dienstag JL, Bell CJ. Etiological spectrum of post-transfusion hepatitis. *Gastroenterology* 1975;69(6):1278-85.

Knodell RG, Ishak KG, Black WC, Chen TS, Craig R, Kaplowitz N, et al. Formulation and application of a numerical scoring system for assessing histological activity in asymptomatic chronic active hepatitis. *Hepatology* 1981;1(5):431-5.

Koziol DE, Holland PV, Alling DW, Melpolder JC, Solomon RE, Purcell RH, et al. Antibody to hepatitis B core antigen as a paradoxical marker for non-A, non-B hepatitis agents in donated blood. *Ann Intern Med* 1986;104(4):488-95.

Krug LP, Lunge VR, Ikuta N, Fonseca ASK, Cheiquer H. Genótipos do vírus da hepatite C (VHC) no Rio Grande do Sul. *Laes Haes* 1997;XVIII(107):78-81.

Kumar D, Farrell GC, Fung C, George J. Hepatitis C virus genotype 3 is cytopathic to hepatocytes: Reversal of hepatic steatosis after sustained therapeutic response. *Hepatology* 2002;36(5):1266-72.

Kunicki TJ, Nugent DJ. Human platelet antigens. In: Hoffman R, Benz EJ Jr, Shattil SJ, Furie B, Cohen HJ, Silberstein LE, et al. **Hematology: basic principles and practice**. 4th ed. Philadelphia: Elsevier Churchill Livingstone; 2005. p. 2387-400.

Kunin CM. Serum hepatitis from whole blood: incidence and relation to source of blood. *Am J M Sc* 1959;237(3):293-303.

Kuo G, Choo QL, Alter HJ, Gitnick GL, Redeker AG, Purcell RH, et al. An assay for circulating antibodies to a major etiologic virus of human non-A, non-B hepatitis. *Science* 1989;244(4902):362-4.

Kuter DJ, Begley CG. Recombinant human thrombopoietin: basic biology and evaluation of clinical studies. *Blood* 2002;100(10):3457-69.

Kuter DJ. Megakaryopoiesis and thrombopoiesis. In: Beutler E, Lichtman MA, Coller BS, Kipps TJ, Seligsohn U. **Williams hematology**. 6th ed. New York: McGraw-Hill; 2001. p. 1339-55.

Kuter DJ. New thrombopoietic growth factors. *Blood* 2007;109(11):4607-16.

Lagasse JP, Causse X, Boulet JM, Djarech H, Ripault MP, Labarrire D. Rémission d'un purpura thrombopénique auto-immun associé à une infection virale C après traitement par l'association interféron-ribavirine. *Gastroenterol Clin Biol* 2001;25(4):429-30.

Lambert N. Value of HCV antigen-antibody combined HCV assay in hepatitis C diagnosis. *Dev Biol (Basel)* 2007;127:113-21.

Lampe E, Almeida AJ, Oliveira RV, Mello CEB, Magalhães MC, Yoshida CFT. Phylogenetic characterization of genotype 4 hepatitis c virus isolate from Brazil. *Virus Rev Res* 2002;7(1 Suppl 1):108.

Lampe E, Yoshida CF, De Oliveira RV, Lauer GM, Lewis-Ximenez LL. Molecular analysis and patterns of ALT and hepatitis C virus seroconversion in hemodialysis patients with acute hepatitis. *Nephrology (Carlton)* 2008;13(3):186-92.

Landau DA, Saadoun D, Calabrese LH, Cacoub P. The pathophysiology of HCV induced B-cell clonal disorders. *Autoimmun Rev* 2007;6(8):581-7.

Laperche S, Lunel F, Izopet J, Alain S, Dény P, Duverlie G, et al. Comparison of hepatitis C virus NS5b and 5' noncoding gene sequencing methods in a multicenter study. *J Clin Microbiol* 2005;43(2):733-9.

Lauer GM, Walker BD. Hepatitis C virus infection. *N Engl J Med* 2001;345(1):41-52.

Lavillette D, Tarr AW, Voisset C, Donot P, Bartosch B, Bain C, et al. Characterization of host-range and cell entry properties of the major genotypes and subtypes of hepatitis C virus. *Hepatology* 2005;(2)41:265-274.

Lerat H, Hollinger FB. Hepatitis C virus (HCV) occult infection or occult HCV RNA detection? *J Infect Dis* 2004;189(1):3-6.

Lerat H, Rumin S, Habersetzer F, Berby F, Trabaud MA, Trépo C, et al. In vivo tropism of hepatitis C virus genomic sequences in hematopoietic cells: influence of viral load, viral genotype, and cell phenotype. *Blood* 1998;91(10):3841-9.

Leroy V, Zarski JP. Clinical applicability of non-invasive markers for liver fibrosis in chronic hepatitis C. *J Hepatol* 2008;48(5):882-4.

Levi JE, Takaoka DT, Garrini RH, Fachini RM, Focaccia R, Santos EB, et al. Three cases of infection with hepatitis C virus genotype 5 among Brazilian hepatitis patients. *J Clin Microbiol* 2002;40(7):2645-7.

Levine SP. Thrombocytopenia: pathophysiology and classification. In: Lee GR, Paraskevas F, Foerster J, Greer JP, Lukens J, Rodgers GM. **Wintrobe's clinical hematology**. 10th ed. Baltimore: Williams & Wilkins; 1999. p. 1579-82.

Levy S, Todd SC, Maecker HT. CD81 (TAPA-1): a molecule involved in signal transduction and cell adhesion in the immune system. *Annu Rev Immunol* 1998;16:89-109.

Liang TJ, Rehermann B, Seeff LB, Hoofnagle JH. Pathogenesis, natural history, treatment, and prevention of hepatitis C. *Ann Intern Med* 2000;132(4):296-305.

Li J, Kuter DJ. The end is just the beginning: megakaryocyte apoptosis and platelet release. *Int J Hematol* 2001;74(4):365-74.

Linares M, Pastor E, Hernández F, Montagud M, Blanquer A. Autoimmune thrombocytopenia and hepatitis C virus infection. *Am J Hematol* 1996;53(4):284.

Linnen J, Wages J Jr, Zhang-Keck ZY, Fry KE, Krawczynski KZ, Alter H, et al. Molecular cloning and disease association of hepatitis G virus: a transfusion-transmissible agent. *Science* 1996;271(5248):505-8.

Liou TC, Chang TT, Young KC, Lin XZ, Lin CY, Wu HL. Detection of HCV RNA in saliva, urine, seminal fluid, and ascites. *J Med Virol* 1992;37(3):197-202.

Li X, Jeffers LJ, Shao L, Reddy KR, de Medina M, Scheffel J, et al. Identification of hepatitis C virus by immunoelectron microscopy. *J Viral Hepat* 1995;2(5):227-34.

Li XM, Jeffers LJ, Shao LJ, De Medina M. Platelets are carriers of HCV-RNA in patients with HCV infection [abstract]. *Gastroenterology* 1994;106(4 Part 2):A903.

Lock G, Dirscherl M, Obermeier F, Gelbmann CM, Hellerbrand C, Knoll A, et al. Hepatitis C – contamination of toothbrushes: myth or reality? *J Viral Hepat* 2006;13(9):571-3.

Lo Re V 3rd, Kostman JR. Management of chronic hepatitis C. *Postgrad Med J* 2005;81(956):376-82.

Lourenço DM. Trombopoese e dinâmica das plaquetas. In: Zago MA, Falcão RP, Pasquini R. **Hematologia: fundamentos e prática**. São Paulo: Atheneu; 2004. p. 69-73.

Ludwig J. The nomenclature of chronic active hepatitis: an obituary. *Gastroenterology* 1993;105(1):274-8.

Lytle JR, Wu L, Robertson HD. The ribosome binding site of hepatitis C virus mRNA. *J Virol* 2001;75(16):7629-36.

Macedo de Oliveira A, White KL, Leschinsky DP, Beecham BD, Vogt TM, Moolenaar RL, et al. An outbreak of hepatitis C virus infections among outpatients at a hematology/oncology clinic. *Ann Intern Med* 2005;142(11):898-902.

Maheshwari A, Ray S, Thuluvath PJ. Acute hepatitis C. *Lancet* 2008;372(9635):321-32.

McCarron B, Fox R, Wilson K, Cameron S, McMennamin J, McGregor G, et al. Hepatitis C antibody detection in dried blood spots. *J Viral Hepat* 1999;6(6):453-6.

McHutchison JG, Dusheiko G, Shiffman ML, Rodriguez-Torres M, Sigal S, Bourliere M, et al. Eltrombopag for thrombocytopenia in patients with cirrhosis associated with hepatitis C. *N Engl J Med* 2007;357(22):2227-36.

McMurray RW. Hepatitis C-associated autoimmune disorders. *Rheum Dis Clin North Am* 1998;24(2):353-74.

McOmish F, Yap PL, Dow BC, Follett EA, Seed C, Keller AJ, et al. Geographical distribution of hepatitis C virus genotypes in blood donors: an international collaborative survey. *J Clin Microbiol.* 1994;32(4):884-92.

Major ME, Rehmann B, Feinstone SM. Hepatitis C viruses. In: Knipe DM, Howley PM, Griffin DE, Martin MA, Lamb RA, Rizman B, et al. **Fields' virology**. 4th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2001. p. 1127-61.

Martins RM, Barbosa AP, Oliveira JM, Vanderborght B, Yoshida CF. Genotype analysis of hepatitis C virus in Brazilian hemophiliacs and blood donors. *Vox Sang*. 2000;78(4):255.

Martins RM, Teles SA, Freitas NR, Motta-Castro AR, Souto FJ, Mussi A, et al. Distribution of hepatitis C virus genotypes among blood donors from mid-west region of Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2006;48(1):53-5.

Martins RM, Vanderborght BO, Yoshida CF. Hepatitis C virus genotypes among blood donors from different regions of Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1998;93(3):299-300.

Mathei C, Shkedy Z, Denis B, Kabali C, Aerts M, Molenberghs G, et al. Evidence for a substantial role of sharing of injecting paraphernalia other than syringes/needles to the spread of hepatitis C among injecting drug users. *J Viral Hepat* 2006;13(8):560-70.

Matsumura I, Kanakura Y. Molecular control of megakaryopoiesis and thrombopoiesis. *Int J Hematol* 2002;75(5):473-83.

Maylin S, Martinot-Peignoux M, Moucari R, Boyer N, Ripault MP, Cazals-Hatem D, et al. Eradication of hepatitis C virus in patients successfully treated for chronic hepatitis C. *Gastroenterology* 2008;135(3):821-9.

Mayo MJ. Extrahepatic manifestations of hepatitis C infection. *Am J Med Sci* 2003;325(3):135-48.

Meertens L, Bertaux C, Dragic T. Hepatitis C virus entry requires a critical post-internalization step and delivery to early endosomes via clathrin coated vesicles. *J Virol* 2006;80(23):11571-8.

Memon MI, Memon MA. Hepatitis C: an epidemiological review. *J Viral Hepat* 2002;9(2):84-100.

Ministério da Saúde [homepage na internet]. Doenças transmissíveis. Hepatites virais [acesso em 10 abr 2008]. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/saude/visualizar_texto.cfm?idtxt=21920.

Ministério da Saúde, Secretaria de Políticas de Saúde. Programa Nacional de Hepatites Virais: avaliação da assistência às hepatites virais no Brasil. Brasília: Ministério da Saúde; 2002.

Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. Doenças infecciosas e parasitárias: guia de bolso. 6ª ed. rev. Brasília: Ministério da Saúde; 2006.

Modi AA, Liang TJ. Hepatitis C: a clinical review. *Oral Dis* 2008;14(1):10-4.

Monazahian M, Bohme I, Bonk S, Koch A, Scholtz C, Grethe S, et al. Low density lipoprotein receptor as a candidate receptor for hepatitis C virus. *J Med Virol* 1999;57(3):223-9.

Mondelli MU, Cerino A, Bono F, Cividini A, Maccabruni A, Aricò M, et al. Hepatitis C virus (HCV) core serotypes in chronic HCV infection. *J Clin Microbiol* 1994;32(10):2523-7.

Mondelli MU, Silini E. Clinical significance of hepatitis C virus genotypes. *J Hepatol* 1999;31 Suppl 1:65-70.

Moradpour D, Penin F, Rice CM. Replication of hepatitis C virus. *Nat Rev Microbiol* 2007;5(6):453-63.

Moreno-Otero R. Therapeutic modalities in hepatitis C: challenges and development. *J Viral Hepat* 2005;12(1):10-9.

Muerhoff AS, Leary TP, Simons JN, Pilot-Matias TJ, Dawson GJ, Erker JC, et al. Genomic organization of GB viruses A and B: two new members of the Flaviviridae associated with GB agent hepatitis. *J Virol* 1995;69(9):5621-30.

Muñoz de Rueda P, Casado J, Patón R, Quintero D, Palacios A, Gila A, et al. Mutations in E2-PePHD, NS5A-PKRBD, NS5A-ISDR, and NS5A-V3 of hepatitis C virus genotype 1 and their relationships to pegylated interferon-ribavirin treatment responses. *J Virol* 2008;82(13):6644-53.

Myers RP, Ratziu V, Imbert-Bismut F, Charlotte F, Poynard T; MULTIVIRC Group. Groupe d'Etude Multidisciplinaire sur les Pathologies Liees au Virus C. Biochemical markers of liver fibrosis: a comparison with historical features in patients with chronic hepatitis C. *Am J Gastroenterol* 2002;97(9):2419-25.

Nagamine T, Ohtuka T, Arai T, Takagi H, Mori M. Thrombocytopenia associated with hepatitis C viral infection. *J Hepatol* 1996;24(2):135-40.

Nakao T, Enomoto N, Takada N, Takada A, Date T. Typing of hepatitis C virus (HCV) genomes by restriction fragment length polymorphisms. *J Gen Virol* 1991;72(Pt 9):2105-12.

Nguyen MH, Keeffe EB. Prevalence and treatment of hepatitis C virus genotypes 4, 5, and 6. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2005;3(10 Suppl 2):S97-S101.

NIH. National Institutes of Health Consensus Development Conference Statement: Management of hepatitis C 2002 (June 10-12 2002). *Gastroenterology* 2002;123(6):2082-2099.

Ohno O, Mizokami M, Wu RR, Saleh MG, Ohba K, Orito E, et al. New hepatitis C virus (HCV) genotyping system that allows for identification of HCV genotypes 1a, 1b, 2a, 2b, 3a, 3b, 4, 5a, and 6a. *J Clin Microbiol* 1997;35(1):201-7.

Okamoto H, Sugiyama Y, Okada S, Kurai K, Akahane Y, Sugai Y, et al. Typing hepatitis C virus by polymerase chain reaction with type-specific primers: application to clinical surveys and tracing infectious sources. *J Gen Virol* 1992 July;73(Pt 3):673-9.

Okuse C, Yotsuyanagi H, Koike K. Hepatitis C as a systemic disease: virus and host immunologic responses underlie hepatic and extrahepatic manifestations. *J Gastroenterol* 2007;42:857-865.

Oliveira GC, Carmo RA, Rocha MO, Silva MO, Lima AT, Guimarães MD. Hepatitis C virus genotypes in hemophiliacs in the state of Minas Gerais, Brazil. *Transfusion*. 1999;39(11-12):1194-9.

Oliveira JM, Martins PP, Peres da Silva A, Mendes ACO, Almeida LDS, Oliveira RV, et al. Changes in prevalence of HCV genotypes in 2000-2007 in a cohort of patients living in Rio de Janeiro, Brazil. *Virus Rev Res* 2007;12(Supl 1):203.

Oliveira ML, Bastos FI, Sabino RR, Paetzold U, Schreier E, Pauli G, et al. Distribution of HCV genotypes among different exposure categories in Brazil. *Braz J Med Biol Res* 1999;32(3):279-82.

Oliveira UB. Hepatitis C virus perinatal transmission. *Braz J Infect Dis* 2001;11(5 Suppl 1):10-1.

Ono E, Shiratori Y, Okudaira T, Imamura M, Teratani T, Kanai F, et al. Platelet count reflects stage of chronic hepatitis C. *Hepatol Res* 1999;15(3):191-200.

Ortiz-Movilla N, Lázaro P, Rodríguez-Iñigo E, Bartolomé J, Longo I, Lecona M, et al. Hepatitis C virus replicates in sweat glands and is released into sweat in patients with chronic hepatitis C. *J Med Virol* 2002;68(4):529-36.

Owsianka AM, Timms JM, Tarr AW, Brown RJ, Hickling TP, Szwejk A, et al. Identification of conserved residues in the E2 envelope glycoprotein of the hepatitis C virus that are critical for CD81 binding. *J Virol* 2006;80(17):8695-704.

Palekar NA, Harrison SA. Extrahepatic manifestations of hepatitis C. *South Med J* 2005;98(10):1019-23.

Panzer S, Seel E, Brunner M, Körmöczki GF, Schmid M, Ferenci P, et al. Platelet autoantibodies are common in hepatitis C infection, irrespective of the presence of thrombocytopenia. *Eur J Haematol* 2006;77(6):513-517.

Paraná R, Vitvitski L, Berby F, Portugal M, Cotrim HP, Cavalcante A, et al. HCV infection in the northeastern Brazil: unexpected high prevalence of genotype 3a and absence of African genotypes. *Arq Gastroenterol* 2000;37(4):213-6.

Parise LV, Boudignon-Proudhon C, Keely PJ, Naik UP. Platelets in hemostasis and thrombosis. In: Lee GR, Foerster J, Lukens J, Paraskevas F, Greer JP, Rodgers GM. **Wintrobe's clinical hematology**. 10th ed. Baltimore: Williams & Wilkins; 1999. p. 661-83.

Parise LV, Smyth SS, Collier BS. Platelet morphology, biochemistry, and function. In: Beutler E, Lichtman MA, Collier BS, Kipps TJ, Seligsohn U. **Williams hematology**. 6th ed. New York: McGraw-Hill; 2001. p. 1357-1408.

Parker SP, Cubitt WD, Ades AE. A method for the detection and confirmation of antibodies to hepatitis C virus in dried blood spots. *J Virol Methods* 1997;68(2):199-205.

Patel K, Gordon SC, Jacobsen I, Hezode C, Oh E, Smith KM, et al. Evaluation of a panel of non-invasive serum markers to differentiate mild from moderate-to-advanced liver fibrosis in chronic hepatitis C patients. *J Hepatol* 2004;41(6):935-42.

Pavio N, Lai MM. The hepatitis C virus persistence: how to evade the immune system? *J Biosci* 2003;28(3):287-304.

Pawlotsky JM, Ben Yahia M, Andre C, Voisin MC, Intrator L, Roudot-Thoraval F, et al. Immunological disorders in C virus chronic active hepatitis: a prospective case-control study. *Hepatology* 1994;19(4):841-8.

Pawlotsky JM, Bouvier M, Fromont P, Deforges L, Duval J, Dhumeaux D, et al. Hepatitis C virus infection and autoimmune thrombocytopenic purpura. *J Hepatol* 1995;23(6):635-9.

Pawlotsky JM, Chevaliez S, McHutchison JG. The hepatitis C virus life cycle as a target for new antiviral therapies. *Gastroenterology* 2007;132(5):1979-98.

Pawlotsky JM. Diagnostics testing in hepatitis C virus infection: viral kinetics and genomics. *Semin Liver Dis* 2003a;23 Suppl 1:3-11.

Pawlotsky JM, Gish RG. Future therapies for hepatitis C. *Antivir Ther* 2006;11(4):397-408.

Pawlotsky JM. Molecular diagnosis of viral hepatitis. *Gastroenterology* 2002a;122(6):1554-68.

Pawlotsky JM, Prescott L, Simmonds P, Pellet C, Laurent-Puig P, Labonne C, et al. Serological determination of hepatitis C virus genotype: comparison with a standardized genotyping assay. *J Clin Microbiol* 1997;35(7):1734-9.

Pawlotsky JM, Roudot-Thoraval F, Simmonds P, Mellor J, Ben Yahia MB, André C, et al. Extrahepatic immunologic manifestations in chronic hepatitis C and hepatitis C serotypes. *Ann Intern Med* 1995;122(3):169-73.

Pawlotsky JM. Use and interpretation of hepatitis C virus diagnostic assays. *Clin Liver Dis* 2003b;7(1):127-37.

Pawlotsky JM. Use and interpretation of virological tests for hepatitis C. *Hepatology*. 2002b;36(5 Suppl 1):S65-73.

Peck-Hadosavljevic M, Wichlas M, Homoncik-Kraml M, Kreil A, Hofer H, Jessner W, et al. Rapid suppression of hematopoiesis by standard or pegylated interferon- α . *Gastroenterology* 2002;123(1):141-51.

Penin F, Dubuisson J, Rey FA, Moradpour D, Pawlotsky JM. Structural biology of hepatitis C virus. *Hepatology* 2004;39(1):5-19.

Pereira BJ, Milford EL, Kirkman RL, Levey AS. Transmission of hepatitis C virus by organ transplantation. *N Eng J Med* 1991;325(7):454-60.

Perz JF, Farrington LA, Pecoraro C, Hutin YJF, Armstrong GL. Estimated global prevalence of hepatitis C virus infection [abstract 957]. 42nd Annual Meeting of the Infectious Diseases Society of America; 2004 Sept 30-Oct; Boston, Massachusetts (USA). IDSA: Arlington, Virginia;2004:214.

Pham TN, Michalak TI. Occult persistence and lymphotropism of hepatitis C virus infection. *World J Gastroenterol* 2008;14(18):2789-93.

Pohl A, Behling C, Oliver D, Kilani M, Monson P, Hassanein T. Serum aminotransferase levels and platelet counts as predictors of degree of fibrosis in chronic hepatitis C virus infection. *Am J Gastroenterol* 2001;96(11):3142-6.

Pileri P, Uematsu Y, Campagnoli S, Galli G, Falugi F, Petracca R, et al. Binding of hepatitis C virus to CD81. *Science* 1998;282(5390):938-41.

Pockros PJ, Duchini A, McMillan R, Nyberg LM, McHutchison J, Viernes E. Immune thrombocytopenic purpura in patients with chronic hepatitis C virus infection. *Am J Gastroenterol* 2002;97(8):2040-5.

Popper H, Schaffner F. The vocabulary of chronic hepatitis. *N Engl J Med* 1971;284(20):1154-6.

Poynard T, Yuen MF, Ratziu V, Lai CL. Viral hepatitis C. *Lancet* 2003;362(9401):2095-100.

Pozzato G, Mazzaro C, Crovatto M, Modolo ML, Ceselli S, Mazzi G, et al. Low-grade malignant lymphoma, hepatitis C virus infection, and mixed cryoglobulinemia. *Blood* 1994;84(1):3047-53.

Prati D. Transmission of hepatitis C virus by blood transfusions and other medical procedures: a global review. *J Hepatol* 2006;45(4):607-16.

Prince AM, Brotman B, Grady GF, Kuhns WJ, Hazzi C, Levine RW, et al. Long-incubation post-transfusion hepatitis without serological evidence of exposure to hepatitis-B virus. *Lancet* 1974;2(7875):241-6.

Prince AM, Stephan AM, Brotman B. Inactivation of non-A, non-B virus infectivity by a beta propiolactone/ultraviolet irradiation treatment and Aerosil adsorption procedure used for preparation of a stabilized human serum. *Vox Sang* 1984;46(2):80-5.

Prince AM, Stephan W, Dichtelmüller H, Brotman B, Huima T. Inactivation of the Hutchinson strain of non-A, non-B hepatitis virus by combined use of β -propiolactone and ultraviolet irradiation. *J Med Virol* 1985;16(2):119-25.

Pugliese A, Gennero L, Cutufia M, Enrietto M, Morra E, Pescarmona P, et al. HCV infective virions can be carried by human platelets. *Cell Biochem Funct* 2004;22(6):353-8.

Pugnale P, Herrmann E, Neumann AU, Pawlotsky JM, Schalm SW, Ferrari C, et al. Hepatitis C viral kinetics in plasma and peripheral blood mononuclear cells during pegylated interferon-alpha2a/ribavirin therapy. *J Hepatol* 2008;48(6):932-8.

Purcell RH. Viral hepatitis. *Prev Med* 1974;3(4):529-34.

Pyrsopoulos NT, Reddy KR. Extrahepatic manifestations of chronic viral hepatitis. *Curr Gastroenterol Rep* 2001;3(1):71-8.

Radkowski M, Gallegos-Orozco JF, Jablonska J, Colby TV, Walewska-Zielecka B, Kubicka J, et al. Persistence of hepatitis C virus in patients successfully treated for chronic hepatitis C. *Hepatology* 2005;41(1):106-114.

Rajan S, Liebman HA. Treatment of hepatitis C related thrombocytopenia with interferon alpha. *Am J Hematol* 2001;68(3):202-9.

Ramos-Casals M, Font J. Extrahepatic manifestations in patients with chronic hepatitis C virus infection. *Curr Opin Rheumatol* 2005;17(4):447-55.

Ritchie A, Braun SE, He J, Broxmeyer HE. Thrombopoietin-induced conformational change in p53 lies downstream of the p44/p42 mitogen activated protein kinase cascade in the human growth factor-dependent cell line M07e. *Oncogene* 1999;18(7):1465-77.

Roberts EA, Yeung L. Maternal-infant transmission of hepatitis C virus infection. *Hepatology* 2002;36(5 Suppl 1):S106-13.

Robertson B, Myers G, Howard C, Bretin T, Bukh J, Gaschen B, et al. Classification, nomenclature, and database development for hepatitis C virus (HCV) and related viruses: proposals for standardization. *Arch Virol* 1998;143(12):2493-503.

Roccasecca R, Ansuini H, Vitelli A, Meola A, Scarselli E, Acali S, et al. Binding of the hepatitis C virus E2 glycoprotein to CD81 is strain specific and is modulated by a complex interplay between hypervariable regions 1 and 2. *J Virol* 2003;77(3):1856-67.

Roingard P, Hourieux C. Hepatitis C virus core protein, lipid droplets and steatosis. *J Viral Hepat* 2008;15(3):157-64.

Roque-Afonso AM, Ducoulombier D, Di Liberto G, Kara R, Gigou M, Dussaix E, et al. Compartmentalization of hepatitis C virus genotypes between plasma and peripheral blood mononuclear cells. *J Virol* 2005;79(10):6349-57.

Roque-Afonso AM, Jiang J, Penin F, Tareau C, Samuel D, Petit MA, et al. Nonrandom distribution of hepatitis C virus quasispecies in plasma and peripheral blood mononuclear cell subsets. *J Virol* 1999;73(11):9213-21.

Rosemberg PM. Hepatitis C: a hepatologist's approach to an infectious disease. *Clin Infect Dis* 2001;33(10):1728-33.

Ross RS, Viazov SO, Holtzer CD, Beyou A, Monnet A, Mazure C, et al. Genotyping of hepatitis C virus isolates using CLIP sequencing. *J Clin Microbiol* 2000;38(10):3581-4.

Russo MW, Fried MW. Side effects of therapy for chronic hepatitis C. *Gastroenterology* 2003;124(6):1711-9.

Saadeh S, Cammell G, Carey WD, Younossi Z, Barnes D, Easley K. The role of liver biopsy in chronic hepatitis C. *Hepatology* 2001;33(1):196-200.

Sakuraya M, Murakami H, Uchiumi H, Hatsumi N, Akiba T, Yokohama A, et al. Steroid-refractory chronic idiopathic thrombocytopenic purpura associated with hepatitis C virus infection. *Eur J Haematol* 2002;68(1):49-53.

Sandres K, Dubois M, Pasquier C, Puel J, Izopet J. Determination of HCV genotype using two antibody assays and genome typing. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2001;20(9):666-9.

Santantonio T, Wiegand J, Tilman Geriach J. Acute hepatitis C: current status and remaining challenges. *J Hepatol* 2008;49(4):625-33.

Scarselli E, Ansuini H, Cerino R, Roccasecca RM, Acali S, Filocamo G, et al. The human scavenger receptor class B type I is a novel candidate receptor for the hepatitis C virus. *EMBO J* 2002;21(19):5017-25.

Scheuer PJ. Classification of chronic viral hepatitis: a need for reassessment. *J Hepatol* 1991;13(3):372-4.

Schreiber GB, Busch MP, Kleinmann SH, Korelitz JJ. The risk of transfusion-transmitted viral infections. *N Engl J Med* 1996;334(26):1685-90.

Schulze H, Shivdasani RA. Mechanisms of thrombopoiesis. *J Thromb Haemost* 2005;3(8):1717-24.

Schüttler CG, Caspari G, Jursch CA, Willems WR, Gerlich WH, Schaefer S. Hepatitis C virus transmission by a blood donation negative in nucleic acid amplification tests for viral RNA. *Lancet* 2000;355(9197):41-1.

Scott JD, Gretch DR. Molecular diagnostics of hepatitis C virus infection: a systematic review. *JAMA* 2007;297(7):724-32.

Sebastiani G, Vario A, Guido M, Noventa F, Plebani M, Pistis R, et al. Stepwise combination algorithms of non-invasive markers to diagnose significant fibrosis in chronic hepatitis C. *J Hepatol* 2006;44(4):686-93.

Sebastiani G, Alberti A. Implementing non-invasive markers for liver fibrosis in clinical practice. *J Hepatol* 2008;48(5):880-1.

Seeff LB. Natural history of hepatitis C. *Am J Med* 1999;107(6 Suppl 2):10S-15S.

Seeff LB. Natural history of chronic hepatitis C. *Hepatology* 2002;36(5 Suppl 1):S35-46.

Selby MJ, Choo QL, Berger K, Kuo G, Glazer E, Eckart M, et al. Expression, identification and subcellular localization of the proteins encoded by the hepatitis C viral genome. *J Gen Virol* 1993;74(Pt 6):1103-13.

Sène D, Limal N, Cacoub P. Hepatitis C virus-associated extrahepatic manifestations: a review. *Metab Brain Dis* 2004;19(3-4):357-81.

Shih JWK, Esteban Mur JI, Alter HJ. Non-A, non-B hepatitis: advances and unfulfilled expectations of the first decade. In: Popper H, Schaffnes F. **Progress in liver diseases**. New York: Grune & Stratton; 1986. p. 433-52.

Shimizu YK, Feinstone SM, Purcell RH. Non-A, non-B Hepatitis: ultrastructural evidence for two agents in experimentally infected chimpanzees. *Science* 1979;205(4402):197-80.

Silini E, Locasciulli A, Santoleri L, Gargantini L, Pinzello G, Montillo M, et al. Hepatitis C virus infection in a hematology ward: evidence for nosocomial transmission and impact on hematologic disease outcome. *Haematologica* 2002;87(11):1200-8.

Silva CM, Costi C, Krug LP, Ramos AB, Grandi T, Gandolfi VL, et al. High proportion of hepatitis C virus genotypes 1 and 3 in a large cohort of patients from Southern Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2007;102(7):867-70.

Silva GF, Nishimura NF, Yamanaka A, Caramori CA, Soares EC. Influência dos hábitos regionais na infecção pelo vírus da hepatite C (HCV): o papel do glucoenergano. *GED Gastroenterol Endosc Dig* 2001;20(Supl 1):S40.

Silva LK, Paraná R, Souza SP, Berby F, Kay A, Trepó C, et al. Hepatitis C virus genotypes in a northeastern area of Brazil. *Am J Trop Med Hyg* 2000;62(2):257-60.

Silva M, Li X, Cheinquer H, Kolodny L, Radick J, LaRue S, et al. HCV associated idiopathic thrombocytopenic purpura (ITP) [abstract]. *Gastroenterology* 1992;102(4 Pt 2):A889.

Silvestri F, Barillari G, Fanin R, Pipan C, Falasca E, Salmaso F, et al. The genotype of the hepatitis C virus in patients with HCV-related B cell non-Hodgkin's lymphoma. *Leukemia* 1997;11(12):2157-61.

Simmonds P, Bukh J, Combet C, Deléage G, Enomoto N, Feinstone S, et al. Consensus proposals for a unified system of nomenclature of hepatitis C virus genotypes. *Hepatology* 2005;42(4):962-73.

Simmonds P, Holmes EC, Cha TA, Chan SW, McOmish F, Irvine B, et al. Classification of hepatitis C virus into six major genotypes and a series of subtypes by phylogenetic analysis of the NS-5 region. *J Gen Virol* 1993;74(Pt 11):2391-9.

Simmonds P. Variability of hepatitis C virus. *Hepatology* 1995;21(2):570-83.

Simons JN, Leary TP, Dawson GJ, Pilot-Matias TJ, Muerhoff AS, Schlauder GG, et al. Isolation of novel virus-like sequences associated with human hepatitis. *Nat Med* 1995;1(6):564-569.

Solmone M, Girardi E, Costa F, Pucillo L, Ippolito G, Capobianchi MR. Simple and reliable method for detection and genotyping of hepatitis C virus RNA in dried blood spots stored at room temperature. *J Clin Microbiol* 2002;40(9):3512-4.

Souto FJ, da Silva AG, Yonamine F. Risk of hepatitis C among Brazilian ex-soccer players. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2003;98(8):1025-6.

Souza KP, Luz JA, Teles SA, Carneiro MA, Oliveira LA, Gomes AS, et al. Hepatitis B and C in the hemodialysis unit of Tocantins, Brazil: serological and molecular profiles. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2003;98(5):599-603.

Stasi R, Evangelista ML, Stipa E, Buccisano F, Venditti A, Amadori S. Idiopathic thrombocytopenic purpura: current concepts in pathophysiology and management. *Thromb Haemost* 2008;99(1):4-13.

Stenberg PE, Hill RJ. Platelets and megakaryocytes. In: Lee GR, Foerster J, Lukens J, Paraskevas F, Greer JP, Rodgers GM. **Wintrobe's clinical hematology**. 10th ed. Baltimore: Williams & Wilkins; 1999. p. 615-60.

Sterling RK, Bralow S. Extrahepatic manifestations of hepatitis C virus. *Curr Gastroenterol Rep* 2006;8(1):53-9.

Strader DB, Wright T, Thomas DL, Seeff LB. Diagnosis, management, and treatment of hepatitis C. *Hepatology* 2004;39(4):1147-71.

Stuyver L, Rossau R, Wyseur A, Duhamel M, Vanderborght B, Van Heuverswyn H, et al. Typing of hepatitis C virus isolates and characterization of new subtypes using a line probe assay. *J Gen Virol* 1993;74(Pt 6):1093-102.

Stuyver L, Wyseur A, van Arnhem W, Hernandez F, Maertens G. Second-generation line probe assay for hepatitis C virus genotyping. *J Clin Microbiol* 1996;34(9):2259-66.

Suzuki T, Aizaki H, Murakami K, Shoji I, Wakita T. Molecular biology of hepatitis C virus. *J Gastroenterol* 2007;42(6):411-23.

Tabor E, Gerety RJ, Drucker JA, Seeff LB, Hoofnagle JH, Jackson DR, et al. Transmission of non-A, non-B hepatitis from man to chimpanzee. *Lancet* 1978;1(8062):463-6.

Tabor E, Gerety RJ. Inactivation of an agent of human non-A, non-B hepatitis by formalin. *J Infect Dis* 1980;142(5):767-70.

Takahashi K, Kishimoto S, Yoshizawa H, Okamoto H, Yoshikawa A, Mishiro S. p26 protein and 33-nm particle associated with nucleocapsid of hepatitis C virus recovered from the circulation of infected hosts. *Virology* 1992;191(1):431-4.

Takamizawa A, Mori C, Fuke I, Manabe S, Murakami S, Fujita J, et al. Structure and organization of the hepatitis C virus genome isolated from human carriers. *J Virol* 1991;65(3):1105-13.

Takehara K, Otsuka T, Arai T, Matsuzaki Y, Sato K, Moriguchi M, et al. Detection of hepatitis C virus (HCV) in platelets of type C chronic liver diseases by polymerase chain reaction (PCR) [abstract]. *Gastroenterology* 1994;106(4 Part 2):A995

Taliani G, Badolato MC, Lecce R, Poliandri G, Bozza A, Duca F, et al. Hepatitis C virus RNA in peripheral blood mononuclear cells: relation with response to interferon treatment. *J Med Virol* 1995;47(1):16-22.

Tellinghuisen TL, Evans MJ, von Hahn T. Studying hepatitis C virus: making the best of a bad virus. *J Virol* 2007;81(17):8853-67.

Thabut D, Simon M, Myers RP, Messous D, Thibault V, Imbert-Bismut F, et al. Noninvasive prediction of fibrosis in patients with chronic hepatitis. *Hepatology* 2003;37(5):1220-1.

Thiel HJ, Collett MS, Gould EA, Heinz FX, Houghton M, Meyers G, et al. Flaviviridae. In: Fauquet CM, Mayo MA, Maniloff J, Desselberger U, Ball LA. **Virus taxonomy: Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses.** 2nd ed. London: Elsevier Academic Press; 2005. p. 981-98.

Toghill PJ, Green S, Ferguson R. Platelet dynamics in chronic liver disease with special reference to the role of the spleen. *J Clin Path* 1977;30(4):367-71.

Thomas DL, Zenilman JM, Alter HJ, Shih JW, Galai N, Carella AV, et al. Sexual transmission of hepatitis C virus among patients attending sexually transmitted diseases clinics in Baltimore-an analysis of 309 sex partnerships. *J Infect Dis* 1995;171(4):768-75.

Thomson BJ, Finch RG. Hepatitis C virus infection. *Clin Microbiol Infect* 2005;11(2):86-94.

Torres B, Martin JL, Caballero A, Villalobos M, Olea N. HCV in serum, peripheral blood mononuclear cells and lymphocyte subpopulations in C-hepatitis patients. *Hepatol Res* 2000;18(2):141-151.

Trimoulet P, Bernard PH, de Ledinghen V, Oui B, Chene G, Saint-Marc Girardin MF, et al. Quantitation of hepatitis C virus RNA in plasma and peripheral blood mononuclear cells of patients with chronic hepatitis treated with interferon-alpha. *Dig Dis Sci* 2000;45(1):175-81.

Triyatni M, Saunier B, Maruvada P, Davis AR, Ulianich L, Heller T, et al. Interaction of hepatitis C virus-like particles and cells: a model system for studying viral binding and entry. *J Virol* 2002;76(18):9335-44.

Troesch M, Meunier I, Lapierre P, Lapointe N, Alvarez F, Boucher M, et al. Study of a novel hypervariable region in hepatitis C virus (HCV) E2 envelope glycoprotein. *Virology* 2006;352(2):357-67.

Tuke PW, Grant PR, Waite J, Kitchen AD, Eglin RP, Tedder RS. Hepatitis C virus window-phase infections: closing the window on hepatitis C virus. *Transfusion* 2008;48(4):594-600.

Uygun A, Kadayifc A, Ercin N, Bagci S. Interferon treatment for thrombocytopenia associated with chronic HCV infection. *Int J Clin Pract* 2000;54(10):683-4.

Vanderborght BO, Rouzere C, Ginuino CF, Maertens G, Van Heuverswyn H, Yoshida CF. High prevalence of hepatitis C infection among Brazilian hemodialysis patients in Rio de Janeiro: a one-year follow-up study. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 1995;37(1):75-9.

van der Poel CL. Hepatitis C virus and blood transfusions: past and present risks. *J Hepatol* 1999;31 Suppl 1:101-6.

Van Doorn LJ. Review: molecular biology of the hepatitis C virus. *J Med Virol* 1994;43(4):345-56.

Vassilopoulos D, Calabrese LH. Extrahepatic immunological complications of hepatitis C virus infection. *AIDS* 2005;19(Suppl 3):S123-7.

Wai CT, Greeson JK, Fontana RJ, Kalbfleisch JD, Marrero JA, Conjeevaram HS, et al. A simple noninvasive index can predict both significant fibrosis and cirrhosis in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology* 2003;38(2):518-26.

Walsh JH, Purcell RH, Morrow AG, Chanock RM, Schmidt PJ. Posttransfusion hepatitis after open-heart operations. Incidence after the administration of blood from commercial and volunteer donor populations. *JAMA* 1970;211(2):261-5.

Ward AC, Touw I, Yoshimura A. The Jak-Stat pathway in normal and perturbed hematopoiesis. *Blood* 2000;95(1):19-29.

Warkentin TE, Kelton JG. The platelet life cycle: quantitative disorders. In: Handin RI, Lux SE, Stossel TP. **Blood: principles and practice of hematology**. Philadelphia: Lippincott; 1995. p. 973-1048.

Watt K, Uhanova J, Gong Y, Kaita K, Doucette K, Pettigrew N, et al. Serum immunoglobulins predict the extent of hepatic fibrosis in patients with chronic hepatitis C virus infection. *J Viral hepat* 2004;11(3):251-6.

Westin J, Ydreborg M, Islam S, Alsiö A, Dhillon AP, Pawlotsky JM, et al. A non-invasive fibrosis score predicts treatment outcome in chronic hepatitis C virus infection. *Scand J Gastroenterol* 2008;43(1):73-80.

White JG, Krumwiede M. Some contributions of electron microscopy to knowledge of human platelets. *Thromb Haemost* 2007;98(1):69-72.

Widell A, Shev S, Mansson S, Zhang YY, Foberg U, Norkrans G, et al. Genotyping of hepatitis C virus isolates by a modified polymerase chain reaction assay using type specific primers: epidemiological applications. *J Med Virol* 1994;44(3):272-9.

Willson RA. Extrahepatic manifestations of chronic viral hepatitis. *Am J Gastroenterol* 1997; 92(1):4-17.

Witters P, Freson K, Verslype C, Peerlinck K, Hoylaerts M, Nevens F, et al. Review article: blood platelet number and function in chronic liver disease and cirrhosis. *Aliment Pharmacol Ther* 2008;27(11):1017-29.

Wyke RJ, Tsiquaye KN, Thornton A, White Y, Portmann B, Das PK, et al. Transmission of non-A non-B hepatitis to chimpanzees by factor-IX concentrates after fatal complications in patients with chronic liver disease. *Lancet* 1979;1(8115):520-4.

Xu Z, Choi J, Yen TSB, Lu W, Strohecker A, Govindarajan S, et al. Synthesis of a novel hepatitis C virus protein by ribosomal frameshift. *EMBO J* 2001;20(14):3840-8.

Yen T, Keeffe EB, Ahmed A. The epidemiology of hepatitis C virus infection. *J Clin Gastroenterol* 2003;36(1):47-53.

Yoshizawa H, Itoh Y, Iwakiri S, Kitajima K, Tanaka A, Tachibana T, et al. Non-A, non-B (type 1) hepatitis agent capable of inducing tubular ultrastructures in the hepatocyte cytoplasm of chimpanzees: inactivation by formalin and heat. *Gastroenterology* 1982;82(3):502-6.

Zahn A, Jennings N, Ouwehand WH, Allain JP. Hepatitis C virus interacts with human platelet glycoprotein VI. *J Gen Virol* 2006;87(Pt 8):2243-51.

Zarife MA, de Oliveira EC, Romeu JM, dos Reis MG. Detection of genotype 4 of the hepatitis C virus in Salvador, BA. *Rev Soc Bras Med Trop* 2006;39(6):567-9.

Zehender D, De Maddalena C, Bernini F, Ebranati E, Monti G, Pioltelli P, et al. Compartmentalization of hepatitis C virus quasispecies in blood mononuclear cells of patients with mixed cryoglobulinemic syndrome. *J Virol* 2005;79(14):9145-56.

Zein NN. Clinical significance of hepatitis C virus genotypes. *Clin Microbiol Rev* 2000;13(2):223-35.

Zein NN, Rakela J, Krawitt EL, Reddy KR, Tominaga T, Persing DH. Hepatitis C virus genotypes in the United States: epidemiology, pathogenicity, and response to interferon therapy. Collaborative Study Group. *Ann Intern Med*. 1996;125(8):634-9.

Zignego AL, Ferri C, Pileri SA, Caini P, Bianchi FB; for the Italian Association of the Study of Liver Commission on Extrahepatic Manifestations of HCV infection. Extrahepatic manifestations of Hepatitis C Virus infection: a general overview and guidelines for a clinical approach. *Dig Liver Dis* 2007a;39(1):2-17.

Zignego AL, Giannini C, Ferri C. Hepatitis C virus-related lymphoproliferative disorders: an overview. *World J Gastroenterol* 2007b;13(17):2467-78.

ANEXOS

ANEXO A – Memorando emitido pela Comissão de Ética em Pesquisa do HUGG (MEMO CEP / Nº 32 / 2004, em 30 de agosto de 2004) sobre o projeto de pesquisa “Avaliação de fatores virais envolvidos na patogênese da trombocitopenia associada ao vírus da hepatite C”.

ANEXO B – Carta de aceitação do artigo “Detection of hepatitis C virus in platelets: evaluating its relationship to antiviral therapy outcome”, de autoria de De Almeida AJ, Campos-de-Magalhães M, Brandão-Mello CE, de Oliveira RV, do Espírito-Santo MP, Yoshida CF, Lampe E, submetido para publicação na revista Hepato-Gastroenterology em 19 de novembro de 2007. Aceito para publicação na revista Hepato-Gastroenterology em 10 de dezembro de 2007.

ANEXO C – Carta de submissão do artigo “Autoimmune thrombocytopenia related to chronic hepatitis C virus infection”, de autoria de De Almeida AJ, Campos-de-Magalhães M, Antonietti CL, Brandão-Mello CE, de Oliveira RV, do Espírito-Santo MP, Yoshida CF, Lampe E, submetido para publicação na revista Hematology em 11 de junho de 2008.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)