



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”  
FACULDADE DE MEDICINA**

**Daniel Contiero Battistam**

**Avaliação da Carga Viral do Vírus da Hepatite C (VHC) no  
Plasma Pobre em Plaquetas**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de Botucatu, para obtenção do título de Mestra em Pesquisa e Desenvolvimento: Biotecnologia Médica.

**Botucatu**

**2019**

Daniel Contiero Battistam

Avaliação da Carga Viral do Vírus da Hepatite  
C (VHC) no Plasma Pobre em Plaquetas

Dissertação apresentada à Faculdade de  
Medicina, Universidade Estadual Paulista  
“Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de  
Botucatu, para obtenção do título de  
Mestra em Pesquisa e Desenvolvimento:  
Biotecnologia Médica.

Orientador: Prof. Dr. Angelo José Magro

Coorientadora: Profa. Dra. Rejane Maria Tommasini Grotto

Botucatu  
2019

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.  
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP  
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Battistam, Daniel Contiero.

Avaliação da carga viral do VHC no plasma pobre em plaquetas / Daniel Contiero Battistam. - Botucatu, 2019

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de Botucatu

Orientador: Angelo José Magro

Coorientador: Rejane Maria Tommasini Grotto

Capes: 90300009

1. Carga viral. 2. Hepatite C. 3. Plaquetas. 4. Plasma.

Palavras-chave: Carga Viral; Hepatite C ; Plasma Pobre em Plaquetas.

*Dedicatória*

**Dedico este trabalho à minha família, que como raízes, me sustentam e me fortalecem.**

*Agradecimientos*

Aos meus pais, Luiz Alberto Battistam e Maria Elvira Contiero Battistam, por moldarem meu caráter e me incentivarem na busca de conhecimento. Ao meu irmão, Gabriel Contiero Battistam, pelo companheirismo e cumplicidade.

À minha noiva, Julia Garcia Bueno Vasconcellos Boselli, que representa a família que quero construir. Aos meus sogros, Luiz Roberto Vasconcellos Boselli e Cristiana Bueno; e cunhado, Pedro Garcia Bueno Vasconcellos Boselli, pelo acolhimento e motivação.

Aos amigos de longa data, Hugo, João Gabriel, Guilherme Rodrigues, Vitor Bueno, Diego, Luis, Fausto, Anderson, Vinícius, Kiko pela amizade que carrego e me fortalece todos os dias.

Aos amigos novos, Gustavo, Hugo, Vinícius, Vinícius, Fernanda, Nathália, Paulo, Rafaela, Giovana, Alex, Camila, por acreditarem no meu sucesso e acompanharem essa jornada de perto.

À colega Gabriela Boni Poli, pela contribuição na pesquisa e troca de conhecimento.

Ao meu orientador Prof. Dr. Angelo José Magro, que sempre se mostrou solícito e a quem cultivo imensa admiração.

À minha coorientadora Prof. Dra. Rejane Maria Tommasini Grotto, por todo aprendizado adquirido.

Ao Prof. Dr. Rafael Plana Simões, pela contribuição nas análises estatísticas para elaboração de nosso projeto.

À Dra. Valéria Nogueira Dias Paes Secco, por todo acolhimento durante meu ano de aprimoramento profissional e incentivo na pesquisa científica.

*Epígrafe*

*Apenas quando somos instruídos pela realidade é  
que podemos mudá-la  
(Bertolt Brecht).*

# *Prefácio*

*Prezo muito pelos detalhes. Talvez isso tenha sido o grande influenciador do meu interesse na área de biológicas. Biomédico de formação, após a conclusão da graduação optei pelo aprimoramento profissional no programa de Imuno-hematologia da Faculdade de Medicina de Botucatu (FMB). Ao concluir o aprimoramento, me senti preparado para atuar profissionalmente na área de Análises Clínicas e consegui um emprego em um laboratório que atendia rotina de hospital. Com isso, comecei a esculpir minha atuação no campo profissional que se estende até os dias atuais.*

*Considero o aprendizado uma das maiores experiências que a vida pode nos fornecer. Os novos ares em busca de conhecimento me impulsionaram a optar por ingressar no programa de Pós-Graduação em Pesquisa e Desenvolvimento – Biotecnologia Médica no Laboratório de Biologia Molecular da FMB/ Hemocentro de Botucatu, na área de Biologia Molecular.*

*Embora tenha passado por diversas áreas, percebi que elas se relacionam entre si e pude desfrutar de toda essa interdisciplinaridade com o desenvolvimento do meu projeto de mestrado estudando a Avaliação da Carga Viral do Vírus da Hepatite C (VHC) no Plasma Pobre em Plaquetas.*

*Esses dois últimos anos foram cheios de emoções, escolhas, renúncias, alegrias, tristezas, mas o que mais prevalece é a necessidade de caminhar e reconhecer o próprio caminho ao andar. Só tenho a agradecer por toda essa vivência e oportunidade ímpar.*

***Daniel Contiero Battistam***

*Resumo*

A Hepatite C é uma doença hepática de etiologia viral cujo agente é o Vírus da Hepatite C (VHC). A infecção pelo vírus, na grande maioria dos casos evolui para a cronicidade, sendo, portanto, um problema de saúde pública devido ao seu grande potencial de evolução para cirrose e hepatocarcinoma. Portanto, atualmente é fundamental a utilização de testes moleculares como diagnóstico complementar e para o acompanhamento da doença no paciente infectado, assim como para a detecção cada vez mais precoce da infecção pelo VHC. Neste sentido, testes para a detecção de ácidos nucléicos podem ser utilizados para a detecção qualitativa e quantitativa do RNA-VHC no sangue dos pacientes, de modo a avaliar a dinâmica da infecção e definir a conduta terapêutica. Desta forma, o Ministério da Saúde adotou no Brasil uma metodologia baseada na Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (RT-qPCR) precedida de etapa de transcrição reversa para a detecção do material genético viral em amostras de plasma de infectados. A presença do VHC está documentada em outros compartimentos biológicos como células mononucleares do sangue periférico (PBMC) e plaquetas, o que sugere que o protocolo atualmente adotado no Brasil pode superestimar o número de partículas virais ativas, visto que o plasma preparado para a realização desta análise contém uma grande quantidade de plaquetas em relação à contagem total dos indivíduos. Desta forma, a finalidade da execução deste projeto foi comparar a carga viral do VHC em pacientes cronicamente infectados levando-se em conta o protocolo atualmente empregado pelo SUS e outro modificado onde o plasma preparado é praticamente isento de plaquetas. Embora nenhuma diferença estatisticamente significativa tenha sido encontrada na comparação dos protocolos, as inferências estatísticas realizadas a partir dos resultados obtidos demonstraram que o genótipo viral parece, à primeira vista, ser capaz de influenciar a distribuição do VHC nos compartimentos extra-hepáticos, dependendo do tipo de protocolo utilizado. Apesar dos dados e da quantidade de pacientes analisados ainda não indicar de forma segura uma necessidade de mudança técnica no protocolo atual da Rede Nacional de Carga Viral do VHC, os achados deste trabalho sugerem que novos estudos devem ser prontamente realizados, de modo a adequar a conduta terapêutica e o prognóstico de cada paciente portador de Hepatite C.

**Palavras-chave: Plasma pobre em plaquetas; Carga Viral; Hepatite C.**

*Abstract*

Hepatitis C is a liver disease of viral etiology whose agent is Hepatitis C Virus (HCV). This virus infection, in the vast majority of cases, progresses to chronicity and is therefore a public health problem due to its great potential for progression to cirrhosis and hepatocarcinoma. Therefore, the use of molecular tests as a complementary diagnosis and disease control, as well as for early detection of HCV infection, is currently essential. In this sense, tests for the detection of nucleic acids can be used for the qualitative and quantitative detection of HCV RNA in the blood of the patients, in order to evaluate the dynamics of the infection and define the therapeutics. Thus the Brazilian Ministry of Health adopted a methodology based on the Real-Time Polymerase Chain Reaction (RT-qPCR) preceded by a reverse transcription step for the detection of the viral genetic material in plasma samples of infected individuals. The presence of HCV is well documented in other biological compartments such as peripheral blood mononuclear cells (PBMC) and platelets, suggesting that the protocol currently adopted in Brazil may overestimate the number of active viral particles, since the plasma samples prepared for this analysis contains a large amount of platelets. Thus, the purpose of this project was to compare the HCV viral load in chronically infected patients, taking into account the protocol currently used by the SUS and another one modified, where the plasma samples are practically free of platelets. Although no statistically significant difference was found in the comparison of the protocols, statistical inferences from the results showed that the viral genotype appears to influence the distribution of HCV in extra hepatic compartments, depending on the protocol. Although the data and the number of patients analyzed still do not indicate a need for a technical change in the current protocol of the National HCV Viral Load Network, the findings of this study suggest that new studies should be carried out promptly in order improve prognosis and treatment patients.

**Key words: Platelet-poor plasma; Viral load; Hepatitis C.**

## *Lista de ilustrações*

<b>Figura 1.</b> Representação esquemática do VHC, evidenciando as glicoproteínas de envelope (E1 e E2), envelope lipídico, genoma viral (RNA) e proteína do core.....	<b>28</b>
<b>Figura 2.</b> Representação esquemática do genoma do VHC, evidenciando os genes codificadores das proteínas estruturais e não estruturais.....	<b>28</b>
<b>Figura 3.</b> Esquema representativo do ciclo replicativo do VHC, evidenciando os principais elementos envolvidos.....	<b>30</b>
<b>Figura 4.</b> Esquema ilustrativo da determinação da carga viral do VHC pelo protocolo da Rede Nacional de Carga Viral do VHC (protocolo MS) e pelo protocolo com o plasma isento de plaquetas (protocolo MOD) (baseado nos procedimentos propostos por Padovani e colaboradores (2010).....	<b>39</b>
<b>Figura 5.</b> Diagrama da análise de correspondência múltipla (MCA) <b>(A)</b> e método ROC <b>(B)</b> referentes às cargas virais calculadas pelos protocolos MS e MOD e outros parâmetros relacionados pacientes estudados.....	<b>51</b>

*Lista de tabelas*

<b>Tabela 1.</b>	Caracterização demográfica, virológica e clínica dos pacientes estudados (n =20).....	<b>42</b>
<b>Tabela 2.</b>	Comorbidades e uso de medicamentos dos pacientes estudados (n=20).....	<b>44</b>
<b>Tabela 3.</b>	Coinfecção viral com VHB e/ou VIH, terapia antiviral e fibrose hepática dos pacientes estudados (n=20).....	<b>45</b>
<b>Tabela 4.</b>	Avaliação comparativa das cargas virais aferidas pelo protocolo da Rede Nacional de Carga Viral do VHC (protocolo MS) e pelo protocolo baseado na análise do plasma isento de plaquetas (protocolo MOD).....	<b>47</b>

*Lista de abreviaturas, siglas e  
símbolos*

**μL:** Microlitro

**°C:** Graus Celsius

**ALT:** Alanina aminotransferase

**AST:** Aspartato aminotransferase

**CD81:** *Cluster of Differentiation 81*

**CLDN1:** Claudina-1

**CV:** Carga Viral

**DAAs:** Drogas antivirais de ação direta (*direct-acting antivirals*)

**E1:** Glicoproteína 1 do envelope

**E2:** Glicoproteína 2 do envelope

**EDTA:** Ácido etilenodiaminotetracético

**EGFR:** *Epidermal Growth Factor Receptor*

**ELISA:** Ensaio de Imunoabsorção Enzimática (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*)

**EphA2:** Efrina A2 (*Ephrin Type-A Receptor 2*)

**GAG:** Glicosaminoglicanas (*Glycosaminoglycans*)

**HIV:** Vírus da Imunodeficiência Humana (*Human Immunodeficiency Virus*)

**HTAs:** *Host-target agents*

**IgG:** Imunoglobulina G

**IRES:** *Internal Ribosomal Entry Site*

**LDLR:** Receptor de Lipoproteína de Baixa Densidade (*Low-density lipoprotein receptor*)

**Log:** Logaritmo

**mL:** Mililitro

**MS:** Ministério da Saúde

**NS2:** Proteína não estrutural 2 do genoma do VHC

**NS3:** Proteína não estrutural 3 do genoma do VHC

**NS4A:** Proteína não estrutural 4A do genoma do VHC

**NS4B:** Proteína não estrutural 4B do genoma do VHC

**NS5A:** Proteína não estrutural 5A do genoma do VHC

**NS5B:** Proteína não estrutural 5B do genoma do VHC

**OCLN:** Ocludina (*Occludin*)

**ORF:** *Open Reading Frame*

**PBMC:** *Peripheral Blood Mononuclear Cell*

**RNA:** Ácido Ribonucleico (*Ribonucleic Acid*)

**RT-qPCR:** Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real precedida de uma etapa de transcrição reversa

**RVS:** Resposta Viroológica Sustentada

**SUS:** Sistema Único de Saúde

**UI:** Unidade Internacional

**UTR:** Região não traduzida (*Untranslated region*)

**VHB:** Vírus da Hepatite B (*Hepatitis B Virus*)

**VHC:** Vírus da Hepatite C (*Hepatitis C Virus*)

**VLDL:** *Very Low Density Lipoprotein*

**xg:** Força g

## *Sumário*

<b>LEVANTAMENTO TEÓRICO.....</b>	<b>25</b>
1.1 Hepatite C: informações gerais e epidemiologia.....	26
2.1 Vírus da Hepatite C (VHC): estrutura, organização genômica e replicação.....	27
3.1 Diagnóstico e Acompanhamento Laboratorial.....	30
4.1 Terapêutica da Hepatite C.....	32
5.1 Influência da compartimentalização biológica do VHC na determinação da carga viral.....	33
<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>35</b>
<b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>37</b>
1.2 Procedência das amostras.....	38
2.2 Coleta e processamento das amostras.....	38
3.2 Análises estatísticas.....	40
<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>41</b>
1.3 Perfil dos pacientes e aferição das cargas virais pelos protocolos MS e MOD.....	42
2.3 Análise das cargas virais determinadas pelos protocolos MS e MOD e possível influência do genótipo na compartimentalização extra-hepática do VHC.....	47
<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>53</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>55</b>

*Levantamento Teórico*

## 1.1 Hepatite C: informações gerais e epidemiologia

A Hepatite C é uma doença hepática de etiologia viral cujo agente é o Vírus da Hepatite C (VHC). A infecção pelo vírus, na grande maioria dos casos (75 a 85%) evolui para a cronicidade (FARIAS, 2011) sendo, portanto, um problema de saúde pública. Esta evolução se deve ao seu grande potencial de evolução para cirrose e hepatocarcinoma (STRAUSS, 2001; SZABÓ et al., 2003). Estima-se que 71 milhões de pessoas no mundo apresentem hepatite C crônica sendo que a doença está associada a, aproximadamente, 399 mil mortes por ano (WHO, 2018). De acordo com o panorama atual, o Brasil registrou 40.198 casos novos de hepatites virais em 2017, sendo que 24.460 casos registrados foram de infecção por VHC (BRASIL, 2018c).

As principais vias de transmissão do VHC são por transfusão de sangue e hemocomponentes, compartilhamento de objetos perfurocortantes e, embora mais raramente, por contato sexual (BRASIL, 2018c). Após a infecção pelo VHC, o indivíduo pode apresentar um quadro de hepatite aguda de forma assintomática/oligosintomática ou sintomática. No primeiro caso, as manifestações clínicas estão ausentes ou são bastante leves e atípicas, simulando um quadro gripal, enquanto que no segundo, a apresentação é típica, com os sinais e sintomas característicos de hepatites, como febre, icterícia e colúria (BRASIL, 2007).

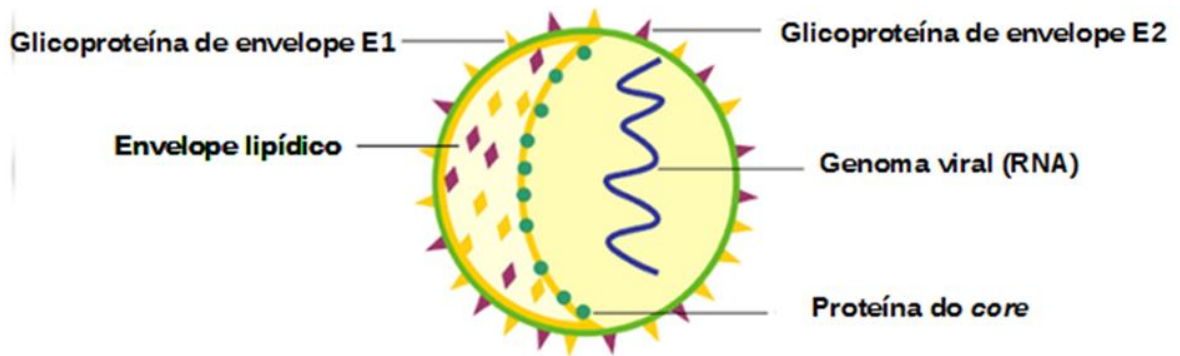
Aproximadamente 20% dos pacientes portadores do VHC apresentam resolução espontânea da doença, que é definida como clareamento espontâneo caracterizado pela não detecção do RNA viral no plasma ou soro do paciente com sorologia anti-VHC reagente. Na maioria dos casos, entretanto, ocorre a evolução para a cronicidade, com a progressão relacionada ao diagnóstico, tratamento e monitoramento da doença (ANJO et al., 2014). Assim, devido à fase assintomática de longa duração associada aos casos crônicos, o diagnóstico da Hepatite C é essencial, assim como o de comorbidades e coinfeções, como a Hepatite B e a aids (BRASIL, 2018c).

Outro fator importante na história natural da doença é a via de transmissão, sendo que a transmissão por transfusão sanguínea está mais associada a forma crônica da doença. Acredita-se que a evolução para cirrose e hepatocarcinoma também dependa de fatores como carga viral e genótipo (BRASIL, 2018b).

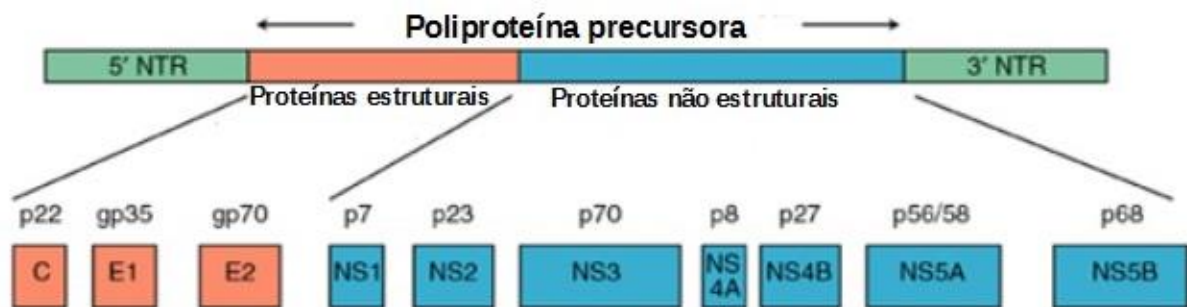
## 2.1 Vírus da Hepatite C (VHC): estrutura, organização genômica e replicação

O VHC pertence à família *Flaviviridae* e apresenta RNA genômico em fita simples com polaridade positiva composta, aproximadamente, por 9,7 quilobases (LINDENBACH; RICE, 2005) (Figura 1). Seu genoma é constituído por uma única fase aberta de leitura (ORF - *open reading frame*) que é flanqueada por duas regiões não traduzidas (3' e 5' UTR) e que codifica uma única poliproteína de 3.011 resíduos de aminoácidos. Esta poliproteína, por sua vez, é processada e origina as proteínas estruturais do envelope (E1 e E2) e uma série de proteínas não-estruturais (NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A, NS5B) (PENIN et al., 2004) (Figura 2).

A similaridade no genoma viral define sete genótipos principais (1 a 7), com variabilidade em sua sequência de nucleotídeos de 30% a 35% (SIMMONDS et al., 1993; MURPHY et al., 2015). Cada genótipo pode ser dividido em subtipos, que são identificados por letras (a, b, c etc). Até o momento, foram descritos cerca de 67 subtipos, sendo que outros 20 ainda estão sendo avaliados. De maneira geral, os subtipos apresentam de 15% a 25% de diferença entre suas sequências nucleotídicas (MESSINA et al., 2015; SMITH et al., 2014). Além disso, variantes distintas do VHC (*quasispecies*) podem ser encontradas no mesmo indivíduo infectado, contribuindo para elevar ainda mais a variabilidade genética do VHC (SIMMONDS et al., 1993; SIMMONDS et al., 2005) e, eventualmente, favorecer a persistência da infecção, uma vez que esta variabilidade possibilita ao vírus evadir-se da resposta imune do hospedeiro. A frequência dos genótipos do VHC está relacionada à região geográfica e, no mundo, o genótipo 1 é o mais prevalente (46,2%), seguido pelo 3 (30,1%). No Brasil o genótipo 1 também é o mais frequente, seguido dos genótipos 3 e 2, respectivamente (GOWER et al., 2014; UMAR et al., 2017).



**Figura 1:** Representação esquemática do VHC, evidenciando as glicoproteínas de envelope (E1 e E2), envelope lipídico, genoma viral (RNA) e proteína do core (Adaptado de *Encyclopedia of Microbiology*, 2009).



**Figura 2:** Representação esquemática do genoma do VHC, evidenciando os genes codificadores das proteínas estruturais e não estruturais (Adaptado de *Encyclopedia of Microbiology*, 2009).

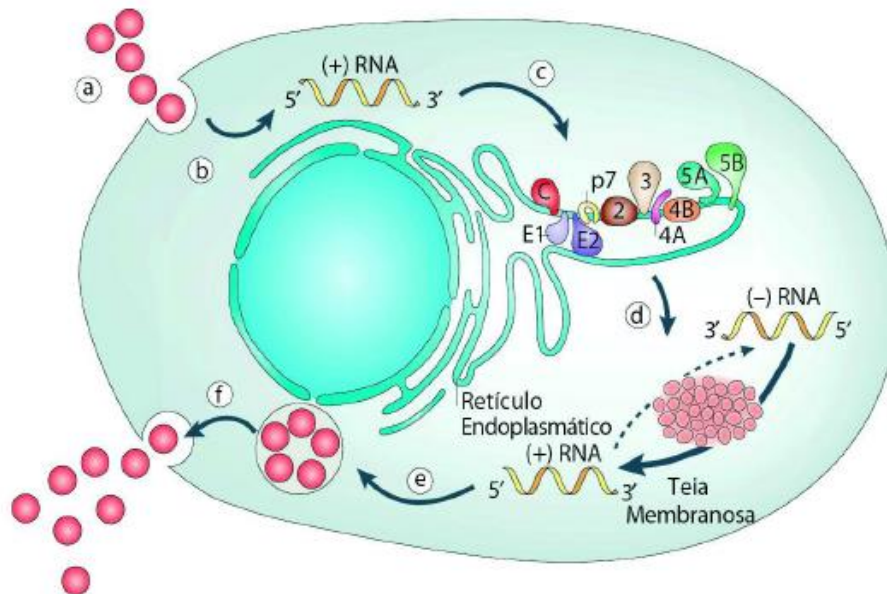
O mecanismo de entrada do VHC na célula hospedeira é um processo complexo e não está completamente definido (BURLONE; BUDKOWSKA, 2009; MIAO et al., 2017). De forma geral, este processo depende de interações entre componentes virais, principalmente as glicoproteínas do envelope viral (E1 e E2) e diversas moléculas de superfície celular do hospedeiro consideradas receptores ou correceptores como a CD81 (PILERI et al., 1998), o receptor de lipoproteína de baixa densidade (LDLR) (AGNELLO et al., 1999), o receptor de lipoproteína de alta densidade (*scavenger* tipo B classe I (SR-BI/Cla1) (SCARSELLI et al., 2002), a claudina-1 (CLDN1) (EVANS et al., 2007), a ocludina (OCLN) (LIU et al., 2009) e as glicosaminoglicanas (GAG) (AGNELLO et al., 1999; CORMIER et al., 2004). A etapa inicial do processo de entrada viral nas células ocorre pela ligação da proteína de

envelope E2 com a tetraspanina CD81, principal receptor associado a entrada do vírus, e, em seguida, eventos de sinalização recrutam a CLDN1 e os receptores de fator de crescimento epidérmico (EGFR - *epidermal growth factor receptor*) e efrina A2 (EphA2 – *ephrin type-A receptor 2*) que modulam a associação CD81-CLDN1. Após a ocorrência da interação CD81-CLDN1, o complexo VHC-receptor interage com a OCLN e internaliza-se nas junções celulares via endocitose por meio da clatrina (RICE, 2014). A fusão do envelope viral com a membrana da célula hospedeira resulta na liberação de RNA viral de polaridade positiva no interior da célula infectada, que irá funcionar como molde para síntese de uma fita de RNA intermediária, de polaridade negativa, utilizada para síntese de novas fitas de RNA. A constituição genômica de novos vírus e o processo de tradução estão relacionados às fitas de RNA de polaridade positiva (LINDENBACH; RICE, 2005).

A síntese proteica do VHC se inicia a partir de uma única poliproteína viral no retículo endoplasmático rugoso. A fita positiva de RNA funciona como molde para a tradução da poliproteína do VHC. Este processo ocorre de maneira independente do *cap*, devido ao *Internal Ribosome Entry Site* (IRES), localizado na porção 5'UTR (KIM; CHANG, 2013). Entre as proteínas produzidas a partir do material genético viral destacam-se as proteínas NS5B (responsável por replicar o genoma viral), NS5A (atua como reguladora da replicação do vírus) e NS3 (com função de helicase, atuando também como protease em etapas posteriores), além da NS4B, que tem papel significativo no rearranjo da membrana celular, levando à formação da chamada “teia membranososa” (ou complexo de replicação), que é caracterizado pela associação de proteínas virais, componentes celulares do hospedeiro e fitas nascentes de RNA e é responsável por compartimentalizar a replicação do VHC (CHEVALIEZ; PAWLOTSKY, 2012). Outros fatores celulares do hospedeiro como a ciclofilina A e o microRNA-122 são também importantes componentes na replicação do vírus, pois promovem interações envolvendo as proteínas não estruturais NS4A e NS5B e ligações com a região não traduzida 5'UTR do genoma viral, respectivamente (SHRIVASTAVA et al., 2015).

Embora os mecanismos referentes ao estágio tardio do ciclo replicativo do VHC não estejam completamente elucidados, sabe-se que a montagem e a liberação da partícula são reguladas com a síntese lipídica da célula hospedeira (Figura 3). Após a clivagem pelas proteases celulares, a proteína do *core* se realoca na membrana do retículo endoplasmático em gotículas de lipídios (SCHEEL; RICE,

2013). Em seguida, o RNA viral é conduzido ao *core* pela NS5B, que também interage com a NS5A. A interação NS5A-*core* aciona a formação do nucleocapsídeo que, então, brotam do lúmen do retículo endoplasmático em um processo ligado à síntese de VLDL (*Very Low Density Lipoprotein*) (BARTOSCH; COSSET, 2006; BARTENSCHLAGER; COSSET; LOHMANN, 2010).



**Figura 3:** Esquema representativo do ciclo replicativo do VHC, evidenciando os principais elementos envolvidos. (a) Contato de internalização do vírion na célula; (b) liberação do RNA viral no citoplasma; (c) tradução e processamento da poliproteína viral; (d) replicação do RNA viral; (e) empacotamento do RNA viral e montagem da partícula; (f) maturação do vírion e liberação (Retirado de BRASIL, 2018b).

### 3.1 Diagnóstico e Acompanhamento Laboratorial

O diagnóstico da infecção, bem como seu acompanhamento laboratorial, está baseado nos diferentes passos da replicação viral. Inicialmente, o diagnóstico laboratorial da infecção pelo VHC baseia-se em uma triagem realizada em soro ou plasma por meio de ensaios sorológicos sendo os imunoenaios do tipo Elisa (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) os mais utilizados.

Este, juntamente com emprego de testes rápidos (imunocromatografia de fluxo), detectam a presença o anticorpo anti-VHC, o qual indica contato prévio com o vírus. O antígeno do core do VHC também pode ser detectado por meio de

imunoensaio e é um indicador de processo infeccioso ativo, auxiliando na confirmação do resultado da pesquisa de anticorpos (BRASIL, 2018b).

Porém, a presença do anti-VHC isoladamente não é suficiente para um acompanhamento clínico e terapêutico adequado no contexto da Hepatite C crônica, além do fato de que existe uma clara dificuldade na diferenciação entre clareamento espontâneo e a sorologia falso-positiva devido ao limiar de reatividade dos testes de triagem (DA SILVA, et al, 2012). Assim, é fundamental a utilização de testes moleculares como diagnóstico complementar e para o acompanhamento da doença no paciente infectado, assim como para a detecção cada vez mais precoce da infecção pelo VHC. Neste sentido, testes para a detecção de ácidos nucleicos podem ser utilizados para a detecção qualitativa do RNA-VHC no sangue dos pacientes (BRASIL, 2018b), embora, no Brasil, o Ministério da Saúde também preconize a utilização de testes quantitativos ou de carga viral (CV) (BRASIL, 2018c), que são capazes de avaliar a dinâmica da infecção por meio da determinação do número de cópias do RNA viral circulante no paciente infectado.

Desta forma, o Ministério da Saúde, no âmbito do Sistema Único de Saúde (SUS), instituiu, desde o ano de 2011, uma Rede Nacional de 56 Laboratórios distribuídos em todo o país para a determinação da carga viral do VHC, embora o exame já fosse realizado no estado de São Paulo desde 2002 como iniciativa da secretaria estadual de saúde, pela então denominada Rede Estadual de Hepatites Virais (BRASIL, 2002). Historicamente, diferentes metodologias foram utilizadas para detecção da carga viral do VHC, sendo que, atualmente, a metodologia utilizada é a Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (RT-qPCR) precedida de etapa de transcrição reversa (BRASIL, 2018b). No Brasil, o protocolo instituído atualmente utiliza um método com sensibilidade entre 12 UI/mL (limite mínimo de detecção da técnica) e 100.000.000 UI/mL (limite máximo de detecção da técnica) (*Abbott Molecular, IL, USA*). Outros testes moleculares ainda são, atualmente, utilizados para determinar o genótipo do VHC (genotipagem), avaliando a presença de genótipos, subtipos e populações mistas do VHC no paciente infectado, visto que a genotipagem auxilia na decisão clínica no que se refere ao esquema antiviral mais adequado à terapêutica de cada paciente (BRASIL, 2018c).

#### 4.1 Terapêutica da Hepatite C

A terapêutica antiviral para o VHC durante muito tempo envolveu a utilização de interferon peguilado associado à ribavirina (BRASIL, 2011). No Brasil, em 2012, entrou em vigor a primeira portaria que regulamentou a utilização clínica das Drogas antivirais de ação direta (DAAs) e, na época, dois inibidores de protease, boceprevir e telaprevir, foram introduzidos nos esquemas antivirais prescritos aos pacientes com hepatite C crônica portadores de variantes virais de genótipo 1 (BRASIL, 2018d). Com a evolução da terapêutica antiviral novos medicamentos foram sendo liberados para utilização clínica, entre os quais é possível citar o sofosbuvir (um análogo nucleotídeo inibidor da enzima polimerase do VHC), o simeprevir (inibidor de protease de segunda geração) e o daclatasvir (inibidor da NS5A), que oferecem maiores taxas de clareamento viral com menores índices de efeitos adversos (BRASIL, 2018c).

Apesar da eficiência dos medicamentos disponíveis outras estratégias de tratamento anti-VHC vem sendo estudadas. Pawlotsky (2014) demonstrou em seu estudo uma nova forma de terapia contra o VHC baseada no desenvolvimento clínico de medicamentos que têm como alvo os chamados *host-target agents* (HTAs), que são moléculas encontradas no hospedeiro. Até o momento, pelo menos dois agentes deste tipo foram desenvolvidos: os inibidores específicos de ciclofilina A e antagonistas de microRNA-122.

O sucesso do esquema terapêutico utilizado é baseado no alcance da resposta virológica sustentada (RVS), que, por sua vez, tem como objetivo a não-deteção do RNA viral por técnicas moleculares (limite de detecção inferior a 12UI/mL) na 12<sup>a</sup> ou 24<sup>a</sup> semana depois do término do tratamento (BRASIL, 2018c). Por outro lado, os pacientes que mantiverem a quantificação do RNA viral (carga viral) detectável durante a terapêutica e depois de finalizada a terapia serão considerados não respondedores e aqueles que mostrarem resposta inicial e voltarem a ter RNA detectável depois de finalizada a terapia serão classificados como recidivantes.

Desta forma, atualmente a RT-qPCR deve ser realizada antes do início da terapia, durante o tratamento e após 12 ou 24 semanas do término do tratamento conforme esquema terapêutico (BRASIL, 2018c), utilizando como material fonte plasma ou soro (BRASIL, 2018b), já que a carga viral (quantificação do RNA do

VHC) nestes fluidos reflete a atividade replicativa viral. No Brasil, a Rede de Hepatites Virais padronizou a utilização do plasma para esta finalidade seguindo o protocolo instituído nacionalmente pelo Ministério da Saúde.

### **5.1 Influência da compartimentalização biológica do VHC na determinação da carga viral**

Embora as células hepáticas constituam o principal alvo do VHC, sua presença em outros compartimentos biológicos como células dendríticas, células mononucleares do sangue periférico (PBMC) e plaquetas já foi documentada (HAMAIA et al., 2001; CASTILLO, et al., 2005; ZHANG et al., 2009; ESPÍRITO-SANTO et al., 2013; PADOVANI et al., 2013), apesar de muitas das partículas virais encontrarem-se inativadas na forma de imunocomplexos e de ainda não haver comprovação de atividade replicativa do vírus nestas células. Entretanto, Watanabe (2016) demonstraram a expressão do VHC tanto na superfície quanto no interior de plaquetas e megacariócitos de doadores saudáveis após infecção *in vitro*, o que sugere que essas células podem ser consideradas carreadoras e/ou sítios de replicação do VHC.

Assim, quando o protocolo atualmente utilizado na Rede Nacional de Carga Viral do VHC é empregado, a carga viral determinada leva em conta os vírus localizados nas plaquetas residuais, uma vez que a quantidade de plaquetas no plasma permanece alta, mesmo levando-se em conta que o número não seja aquele referente à contagem plaquetária total do paciente. Ariede e colaboradores (2015) demonstraram que a carga viral do VHC a partir de plaquetas, mesmo em níveis inferiores às do plasma, se mantém constante por até 144 horas, sugerindo que os vírus carreados nas plaquetas parecem preservar-se por mais tempo quando comparados àqueles livres no plasma.

Desta forma, é possível levantar-se a hipótese de que parte da quantificação do RNA viral a partir do plasma (plasma + plaquetas residuais) pode ser resultante dos vírus carreados nas plaquetas. No entanto, ainda não existem estudos que avaliem se esta quantidade de vírus nas plaquetas pode representar impacto significativo no resultado da carga viral do VHC em pacientes infectados. Esta questão é particularmente relevante quando se considera que o uso do protocolo da Rede Nacional de Carga Viral do VHC pode implicar em uma quantificação

superestimada da carga viral, com óbvia influência na prática terapêutica e custo do tratamento dos doentes pelo SUS. Além disso, a avaliação da possível compartimentalização do VHC nas plaquetas é importante para guiar os médicos no tocante à prática clínica, já que a circulação de plaquetas infectadas com partículas virais viáveis pode resultar em recidivas após clareamento. Logo, a finalidade deste estudo foi comparar as cargas virais do VHC a partir do plasma de pacientes crônicos determinadas pelo protocolo da Rede de Carga Viral do VHC e a partir de um protocolo modificado baseado na análise do plasma isento de plaquetas.

*Objetivos*

Este trabalho tem como meta a execução das atividades referentes aos seguintes objetivos:

- 1) Avaliar a carga viral do VHC no plasma de pacientes com Hepatite C crônica utilizando-se o protocolo da Rede Nacional de Carga Viral do VHC;
- 2) Avaliar a carga viral do VHC no plasma isento de plaquetas de pacientes com Hepatite C crônica utilizando-se um protocolo para determinação da carga viral a partir do plasma isento de plaquetas estabelecido com base no proposto por Padovani e colaboradores (2010);
- 3) Comparar os resultados obtidos na determinação da carga viral obtida com o protocolo da Rede Nacional de Carga Viral do VHC e o protocolo que emprega o plasma isento de plaquetas estabelecido com base no proposto por Padovani e colaboradores (2010);
- 4) Analisar a influência do genótipo viral, hábitos, uso de medicamentos e outras informações clínicas na carga viral dos pacientes estudados.

## *Material e Métodos*

## 1.2 Procedência das amostras

Neste estudo foram utilizadas amostras de 20 pacientes portadores de Hepatite C crônica coletadas de acordo com solicitação médica para a execução do exame de carga viral do VHC e armazenadas no repositório de amostras do Laboratório de Biologia Molecular (Laboratório de Rotinas Diagnósticas em Infecções Virais). As amostras de cada paciente originaram duas alíquotas, sendo uma delas utilizada para avaliação da carga viral plasmática utilizando-se o protocolo da Rede Nacional de Carga Viral do VHC (aqui denominado de protocolo MS) e a outra utilizada para a determinação da carga viral com o emprego de um protocolo baseado na análise do plasma isento de plaquetas (aqui denominado de protocolo MOD). A carga viral a partir do plasma isento de plaquetas foi realizada com o excedente da coleta de sangue do paciente realizada por ocasião de seu atendimento de rotina. O presente projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de Botucatu (CAAE: 81973917.7.0000.5411; número do parecer: 3.014.665).

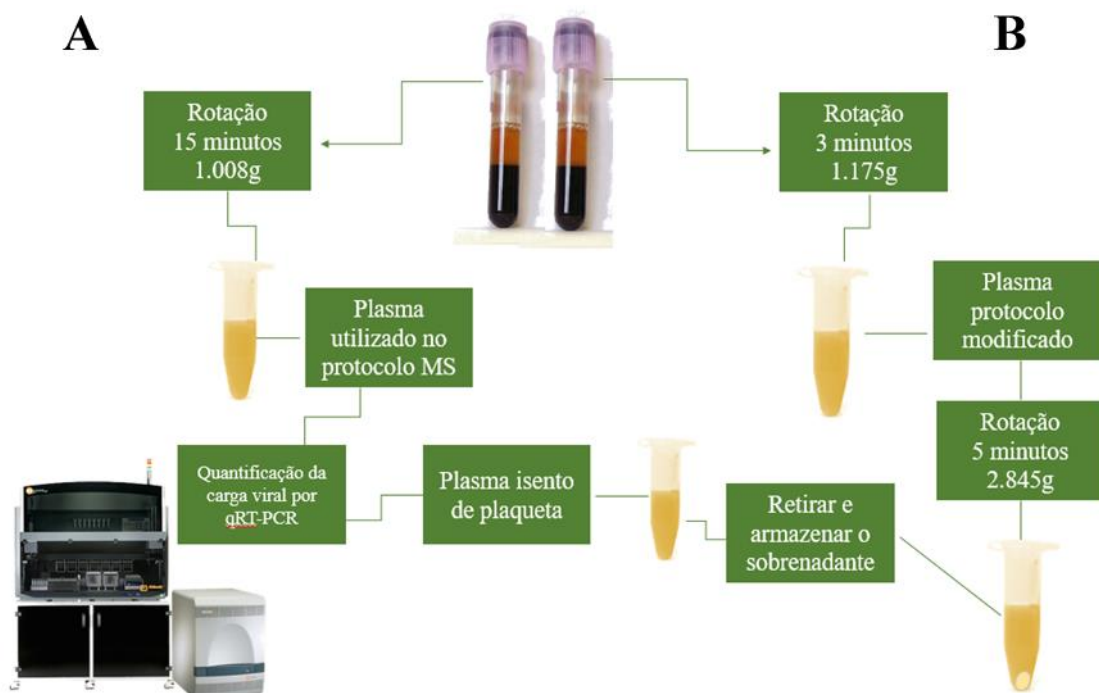
## 2.2 Coleta e processamento das amostras

Todas as amostras de sangue total foram coletadas em tubo do tipo BD *vacutainer*<sup>®</sup> (*Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA*) com 1,5 mg/mL do anticoagulante ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) num volume de 5 mL. As coletas foram realizadas por profissional habilitado e mediante solicitação médica no Ambulatório de Gastroenterologia e Hepatites Virais da Faculdade de Medicina de Botucatu (FMB - Unesp).

Para a obtenção do plasma utilizado no exame de carga viral do VHC de rotina (protocolo MS) as amostras foram submetidas a centrifugação de 1008xg por 15 minutos (Figura 4). Já a obtenção do plasma isento de plaquetas (protocolo MOD) foi realizada com base no protocolo estabelecido por Padovani e colaboradores (2010), com as seguintes modificações: cada amostra foi centrifugada por 3 minutos a 1176xg para realizar a separação de uma alíquota de plasma, a qual foi novamente centrifugada a 2000xg por 5 minutos para a obtenção do plasma isento de plaquetas (Figura 4).

Todas as alíquotas foram armazenadas em freezer -80 °C para posterior análise e a determinação da carga viral no plasma foi realizada por RT-qPCR, sistema *Taqman*, utilizando-se o ensaio *Abbott Real Time HCV* (*Abbott Molecular, IL, USA*), segundo especificações do fabricante. O ensaio utilizado foi o disponível para automação utilizando o *Abbott Sample Preparation System* (*Abbott Molecular, IL, USA*) na fase de isolamento do RNA do plasma e o *Abbott m2000rt* (*Abbott Molecular, IL, USA*) na reação de amplificação e detecção.

Foram coletados também dados demográficos, clínicos (nome, sexo, idade, raça, fator de risco, estadiamento da fibrose hepática, comorbidades e tratamento) e laboratoriais (data do diagnóstico, genótipo do VHC) do prontuário médico dos pacientes incluídos neste estudo.



**Figura 4:** Esquema ilustrativo da determinação da carga viral do VHC **(A)** pelo protocolo da Rede Nacional de Carga Viral do VHC (protocolo MS) e, **(B)** pelo protocolo com o plasma isento de plaquetas (protocolo MOD) (baseado nos procedimentos propostos por Padovani e colaboradores (2010)).

### 3.2 Análises estatísticas

O teste Shapiro-Wilk foi utilizado para verificação da distribuição normal dos valores de carga viral determinada pelos protocolos MS e MOD, realizados com amostras de cada um dos pacientes. Por sua vez, o teste de Wilcoxon foi empregado para a verificação da existência de diferença estatística dos valores de carga viral obtidos em cada um dos testes executados. A existência de correspondências entre as informações coletadas nos prontuários dos pacientes e as cargas virais determinadas pelos protocolos do Ministério da Saúde e o estabelecido por Padovani e colaboradores (2010) com modificações foi verificada por meio de uma análise de correspondência múltipla (MCA - *Multiple Correspondence Analysis*), cuja capacidade de predição foi verificada pelo método ROC (*Receiver Operating Characteristic*). Todas as inferências estatísticas foram realizadas considerando-se um nível de significância de 5% ( $p\text{-value} \leq 0,05$ ).

## *Resultados e Discussão*

### 1.3 Perfil dos pacientes e aferição das cargas virais pelos protocolos MS e MOD

Como evidenciado na Tabela 1, os 20 pacientes incluídos no presente estudo são majoritariamente indivíduos do sexo masculino e apresentam uma mediana de idade de 60 anos. Assim, o conjunto de pacientes aqui estudados está de acordo com o apresentado no Boletim Epidemiológico da Secretaria de Vigilância em Saúde, Ministério da Saúde, Brasil (2018), uma vez que entre os 200.839 casos confirmados de Hepatite C desde 1999, 116.512 (58,0%) ocorreram em indivíduos do sexo masculino e 84.245 (42,0%) em indivíduos do sexo feminino. É importante ressaltar, porém que, apesar do número de casos entre homens ser superior neste estudo, observou-se uma ligeira diminuição da razão entre homens e mulheres infectados ao longo dos anos analisados visto que, em 2007, a razão foi de 1,5, passando para 1,3 no ano de 2017. Dados do Centro de Controle e Prevenção de Doenças (*Centers for Disease Control and Prevention - CDC*) (2016) sobre a incidência de Hepatite C aguda por sexo nos Estados Unidos, no ano de 2001 a 2016, revelam da mesma forma um predomínio dos casos reportados em pessoas do sexo masculino. Neste caso, de acordo com dados de 2016, as taxas entre homens e mulheres foram de 1.1 e 0.9 casos a cada 100.000 habitantes.

**Tabela 1:** Caracterização demográfica, virológica e clínica dos pacientes estudados (n =20).

<b>Idade, anos [mediana (IQR)]</b>	60,5 (57,75-66,25)	
<b>Sexo, Masculino [N (%)]</b>	19 (95,00)	
<b>Genótipo do VHC*</b>	Genótipo 1 [N (%)]	09 (45,00)
	Genótipo 3 [N (%)]	11 (55,00)
<b>Fatores de Risco**</b>	Etilismo [N (%)]	08 (40,00)
	Tabagismo [N (%)]	06 (30,00)
	Cirurgia [N (%)]	10 (50,00)
	Drogas [N (%)]	01 (10,00)
	Transusão sanguínea [N (%)]	02 (20,00)

\* Genotipagem realizada de acordo com a região genômica 5' UTR.

\*\* Informação retirada do prontuário médico dos pacientes.

Considerando-se a idade dos pacientes que fazem parte deste estudo, o conjunto analisado pode também ser considerado representativo, uma vez que a faixa etária próxima aos 60 anos é a que apresenta maior ocorrência de casos notificados de Hepatite C. Em 2017, as taxas de detecção observadas em ambos os sexos, na faixa etária de 55 a 59 anos, indicaram a taxa de 42,4 casos por 100 mil habitantes entre homens e 25,2 entre mulheres (BRASIL, 2018a). Em países como os Estados Unidos e a Austrália a prevalência da infecção é maior em indivíduos entre 30 e 39 anos e menor nas pessoas abaixo de 20 anos e acima de 50 anos, provavelmente devido às maiores taxas de transmissão em um passado recente, aproximadamente entre 10 e 30 anos. Em outros países, como Turquia, Espanha, Itália, Japão e China possuem muitos infectados com mais de 50 anos, o que indica um maior risco de infecção em um passado distante, aproximadamente entre 40 e 60 anos. No Egito, por sua vez, foi registrado um aumento de casos com a idade e simultaneamente ocorre um número significativo de casos em todos os grupos etários, sinalizando um risco aumentado de transmissão em um passado distante que se mantém de maneira contínua (MARTINS; NARCISO-SCHIAVON; SCHIAVON, 2011).

Os pacientes estudados também apresentaram uma variedade de comorbidades e uso de medicamentos, conforme mostrado na Tabela 2. Estes dados estão de acordo com os achados de Jacobson e colaboradores (2010), cujo trabalho indica que mais de um terço dos pacientes com hepatite C crônica pode apresentar pelo menos uma manifestação extra-hepática. Embora o hipotireoidismo seja a comorbidade mais prevalente entre os pacientes alvos do presente trabalho, não podemos afirmar se existe uma associação direta com a Hepatite C, embora Barut e colaboradores (2012) tenham reconhecido que o aparecimento de disfunções tireoidianas pode possivelmente estar associado ao tratamento antiviral com interferon peguilado e ribavirina em pacientes portadores crônicos. Da mesma forma, Hammerstad e colaboradores (2013) avaliaram a associação entre pacientes portadores de Hepatite C e diabetes (WHITE, D. L.; RATZIU, V.; EL-SERAG, H.B, 2008). Estes autores sustentam a hipótese de que a infecção por hepatite C poderia conduzir a defeitos nas vias sinalizadoras de insulina devido a possíveis efeitos diretos do VHC nas células beta da ilhota pancreática. Mesmo assim, não foi possível, considerando o número de pacientes avaliados, estabelecer associações claras e/ou diretas entre a infecção crônica por VHC e as comorbidades constantes

nos prontuários clínicos. É importante também ressaltar que o Protocolo Clínico de Diretrizes Terapêuticas para Hepatite C e Coinfecções (2018) considera como populações prioritárias para teste da Hepatite C pacientes com diagnóstico de diabetes, doenças cardiovasculares, antecedentes psiquiátricos, com histórico de patologia hepática sem diagnóstico, com elevações de ALT e/ou AST, com antecedente de doença renal ou de imunodepressão. Assim, é bastante provável que os pacientes estudados apresentem outras comorbidades, o que não significa que haja uma relação de qualquer nível entre a Hepatite C crônica e as comorbidades identificadas. Os indivíduos incluídos neste estudo também não apresentaram coinfecções com o Vírus da Hepatite B (VHB) e/ou como Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) (Tabela 3).

**Tabela 2:** Comorbidades e uso de medicamentos dos pacientes estudados (n=20).

<b>Medicamentos</b>	Antiarrítmicos*** [N (%)]	1 (5,00)
	Antibióticos [N (%)]	1 (5,00)
	Anticoagulantes [N (%)]	1 (5,00)
	Antidepressivos [N (%)]	2 (10,00)
	Antidiabéticos [N (%)]	2 (10,00)
	Antilipêmicos*** [N (%)]	1 (5,00)
	Benzodiazepínicos [N (%)]	4 (20,00)
	Betabloqueadores*** [N (%)]	8 (40,00)
	Bloqueadores de Canais de Cálcio*** [N (%)]	1 (5,00)
	Complexo Vitamínico [N (%)]	1 (5,00)
	Diuréticos [N (%)]	7 (35,00)
	Imunossupressores*** [N (%)]	2 (10,00)
	Inibidores da Bomba de Próton [N (%)]	3 (15,00)
	Salicilatos [N (%)]	3 (15,00)
	<b>Comorbidades ****</b>	Ansiedade [N (%)]
Ascite [N (%)]		1 (5,00)
Cardiopatias [N (%)]		2 (10,00)
Carcinoma Hepatocelular [N (%)]		1 (5,00)
Diabetes Mellitus [N (%)]		2 (10,00)
Distúrbios Psiquiátricos [N (%)]		1 (5,00)
Doença Hemorroidária [N (%)]		1 (5,00)
Gonorreia [N (%)]		1 (5,00)
Hipertensão Arterial Sistêmica [N (%)]		2 (10,00)

\*\*\*Antiarrítmicos, antidepressivos, antilipêmicos, betabloqueadores, bloqueadores de canais de cálcio e imunossupressores podem apresentar potencial interação medicamentosa com drogas antivirais de

ação direta: necessário ajuste de dose, horário de administração ou monitoramento (BRASIL, 2018c).

\*\*\*\* Informação retirada do prontuário médico dos pacientes.

Em relação ao tratamento antiviral, todos os pacientes estavam utilizando drogas de ação direta (Sofosbuvir + Daclatasvir ou Sofosbuvir + Simeprevir), sendo que em 60% dos pacientes esta terapêutica constituía retratamento e 35% dos pacientes eram naïve, ou seja, não apresentavam exposição prévia a fármacos utilizados na terapêutica anti-VHC (Tabela 3). O retratamento, na ausência de contraindicações ao uso de inibidores de protease, está recomendado para pacientes mono infectados pelo VHC, portadores do genótipo 1, com fibrose hepática avançada (F3 ou F4), com evidências de cirrose por métodos de imagem ou endoscópicos, portadores de doença hepática compensada, pacientes recidivantes com resposta parcial ou nulos de resposta ao tratamento com interferon peguilado e ribavirina e em pacientes que não realizaram tratamento prévio com inibidores de protease (GHANY et al., 2011; BRASIL, 2012). Já os pacientes nunca tratados para Hepatite C são considerados “pacientes virgens de tratamento” (*treatment-naive*) e os portadores de histórico de terapia antiviral para hepatite C são denominados “pacientes experimentados com tratamento” (*treatment-experienced*). A terminologia obedece ao léxico internacional (AASLD-IDSA, 2017) e proporciona fácil interpretação dos quadros terapêuticos.

**Tabela 3:** Coinfecção viral com VHB e/ou HIV, terapia antiviral e fibrose hepática dos pacientes estudados (n=20).

Coinfecção VHB [N (%)]	0 (0,00)
Coinfecção VIH [N (%)]	0 (0,00)
Retratamento [N (%)]	12 (60,00)
Naïve [N (%)]	7 (35,00)
Fibrose F1 [N (%)]****	1 (5,00)
Fibrose F2 [N (%)]****	3 (15,00)
Fibrose F3 [N (%)]****	2 (10,00)
Fibrose F4 [N (%)]****	11 (55,00)

\*\*\*\* De acordo com a classificação Metavir (BEDOSSA; POYNARD, 2006).

O grau F4 de fibrose foi o mais prevalente entre os pacientes (55%), seguido do F2 (15%), F3 (10%) e F1 (5%) (Tabela 3). Devemos considerar que alguns pacientes presentes neste estudo foram considerados não respondedores à terapêutica utilizada anteriormente, o que justifica o grau elevado de fibrose encontrado na maioria dos indivíduos estudados. Além disso, alguns fatores como idade avançada, índice de massa corporal elevado, distúrbios metabólicos, etilismo e tabagismo podem ter contribuído para uma rápida progressão de fibrose e, possivelmente, para a prevalência do grau F4 nos indivíduos (HEDESTIERNA, 2018; BRASIL, 2018c).

Na tabela 4 são apresentados os resultados da carga viral do VHC determinada a partir do plasma obtido pelo protocolo instituído pelo Rede Nacional de Carga Viral do VHC (protocolo MS) em comparação com aqueles obtidos a partir do emprego de um protocolo baseado na análise do plasma isento de plaquetas (protocolo MOD). Quando se avalia o logaritmo decimal da carga viral não houve nenhuma variação maior que 0,5 log entre os pacientes estudados, o que é considerado significativo na decisão clínica. Estudos que empregam análises comparativas da quantificação do RNA viral em amostras biológicas consideram diferenças inferiores a 0,5 log sem significado clínico relevante para o acompanhamento da eficiência terapêutica (BALERIOLA et al., 2011).

Embora nenhuma diferença estatisticamente significativa tenha sido encontrada em logaritmo decimal na comparação dos resultados da carga viral pelos dois protocolos utilizados, quando se avalia os valores das cargas virais em UI/mL é possível notar-se uma diferença aparente. Neste cenário, dos 20 pacientes incluídos neste estudo, 12 (C, D, J, K, L, N, O, P, Q, R, S e T) (60%) apresentaram uma aparente queda na carga viral do VHC aferida pelo protocolo MOD em relação ao protocolo MS (MOD < MS), enquanto que 8 (A, B, I, F, G, H, M e U) mostraram uma aparente elevação da carga viral aferida pelo protocolo MOD quando foi realizada a mesma comparação MS (MOD > MS). Esta observação sugeriu a realização de análises mais detalhadas para possíveis associações (item 2 desta seção).

**Tabela 4:** Avaliação comparativa das cargas virais aferidas pelo protocolo da Rede Nacional de Carga Viral do VHC (protocolo MS) e pelo protocolo baseado na análise do plasma isento de plaquetas (protocolo MOD). Os resultados de CV (carga viral) são expressos em UI/mL e em logaritmo decimal.

Pacientes	Plasma Rotina*		Plasma Modificado**	
	Carga Viral	Log	Carga Viral	Log
A	2.833.827	6,45	3.638.377	6,56
B	263.881	5,42	340.952	5,53
C	1.269.850	6,1	915.927	5,96
D	3.035.079	6,48	2.708.653	6,43
F	1.129	3,05	1.152	3,06
G	4.549.571	6,66	5.649.625	6,75
H	1.369.395	6,14	1.541.310	6,19
I	426.565	5,63	512.701	5,71
J	450.633	5,65	429.208	5,63
K	592.938	5,77	426.284	5,63
L	3.832.470	6,58	2.947.007	6,47
M	2.010.898	6,3	3.049.643	6,48
N	731.040	5,86	597.772	5,78
O	1.894.920	6,28	1.569.681	6,2
P	5.825.423	6,77	4.536.459	6,66
Q	2.263.416	6,35	1.824.863	6,26
R	5.387.299	6,73	3.473.339	6,54
S	266.438	5,43	219.985	5,34
T	190.300	5,28	149.924	5,18
U	90.731	4,96	99.944	5,00

\* *Protocolo de Separação da Rotina Diagnóstica da Rede Nacional de Carga Viral do VHC.*

\*\* *Plasma obtido pelo protocolo modificado (Plasma Isento de Plaquetas).*

### 2.3 Análise das cargas virais determinadas pelos protocolos MS e MOD e possível influência do genótipo na compartimentalização extra-hepática do VHC

Sabe-se que o VHC presente em plaquetas pode estar tanto aderido à membrana quanto internalizado nas mesmas. Devido ao complexo envolvimento de receptores e correceptores do patógeno e moléculas-alvo, os mecanismos de adesão e internalização ainda não estão completamente elucidados. Os vírus que estão aderidos às plaquetas são geralmente recobertos por anticorpos da classe IgG, estando, desta forma, neutralizados e prontos para o fluxo de degradação celular nos hepatócitos (PADOVANI, 2013; ASSINGER, 2014; ARIEDE, 2015). Já os vírus que estão internalizados provavelmente não são neutralizados por IgG e, portanto, não é possível descartar a hipótese de reinfecções em pacientes que já tenham atingido a RVS ou mesmo uma possível existência de atividade replicativa do vírus (ESPÍRITO-SANTO et al., 2013). De toda forma, é claro que a contribuição

dos vírus aderidos ou internalizados na plaqueta pode impactar/superestimar a quantificação da carga viral de pacientes crônicos, com óbvias implicações terapêuticas e de custo de tratamento.

A análise dos resultados deste estudo (carga viral obtida pelos protocolos MS e MOD) mostrou que os dados não apresentavam uma distribuição normal, o que levou ao emprego do teste de Wilcoxon para verificação da existência de diferença estatística dos dados obtidos a partir do emprego dos dois protocolos. O resultado obtido neste último teste demonstrou que as variações verificadas não são estatisticamente significativas considerando-se um nível de significância de 5%, demonstrando assim não haver uma influência dos protocolos no aumento ou diminuição das cargas virais aferidas nas amostras testadas.

Considerando que as plaquetas podem funcionar como reservatório viral ao VHC (HAMAIA et al., 2001; ZHANG et al., 2009; ESPÍRITO-SANTO et al., 2013; PADOVANI et al., 2013; ARIEDE et al., 2015), os resultados demonstram que, dentro do conjunto amostral analisado, o protocolo MS não superestima a carga viral em pacientes com Hepatite C crônica, mesmo que o resultado do exame represente a quantidade de vírus no plasma e plaquetas. Assim, os resultados sugeriram que a quantidade de vírus carregado/internalizado nas plaquetas do paciente infectado não impactou no resultado da carga viral. No entanto, deve-se considerar que todas as amostras incluídas neste estudo apresentavam carga viral elevada (acima de 4,00 log) e, se a mesma avaliação for realizada utilizando amostras com cargas virais em níveis mais baixos, resultados distintos dos aqui apresentados podem ser encontrados. É preciso destacar que não foi possível a inclusão de tais amostras uma vez que a amostragem relativamente pequena aqui utilizada representou todos os pacientes que obedeciam aos critérios de inclusão do serviço médico durante o período de realização deste estudo, o que reflete a melhora significativa na resposta terapêutica da maioria dos afetados (carga viral inferior ao limite de detecção) alcançada desde a introdução dos DAAs no esquema antiviral para Hepatite C crônica. Portanto, os pacientes deste estudo foram submetidos a tratamento/retratamento devido a diagnóstico/detecção do vírus recente (pacientes naive) ou falhas em esquemas terapêuticos anteriores, o que pode justificar os níveis elevados de carga viral encontrados.

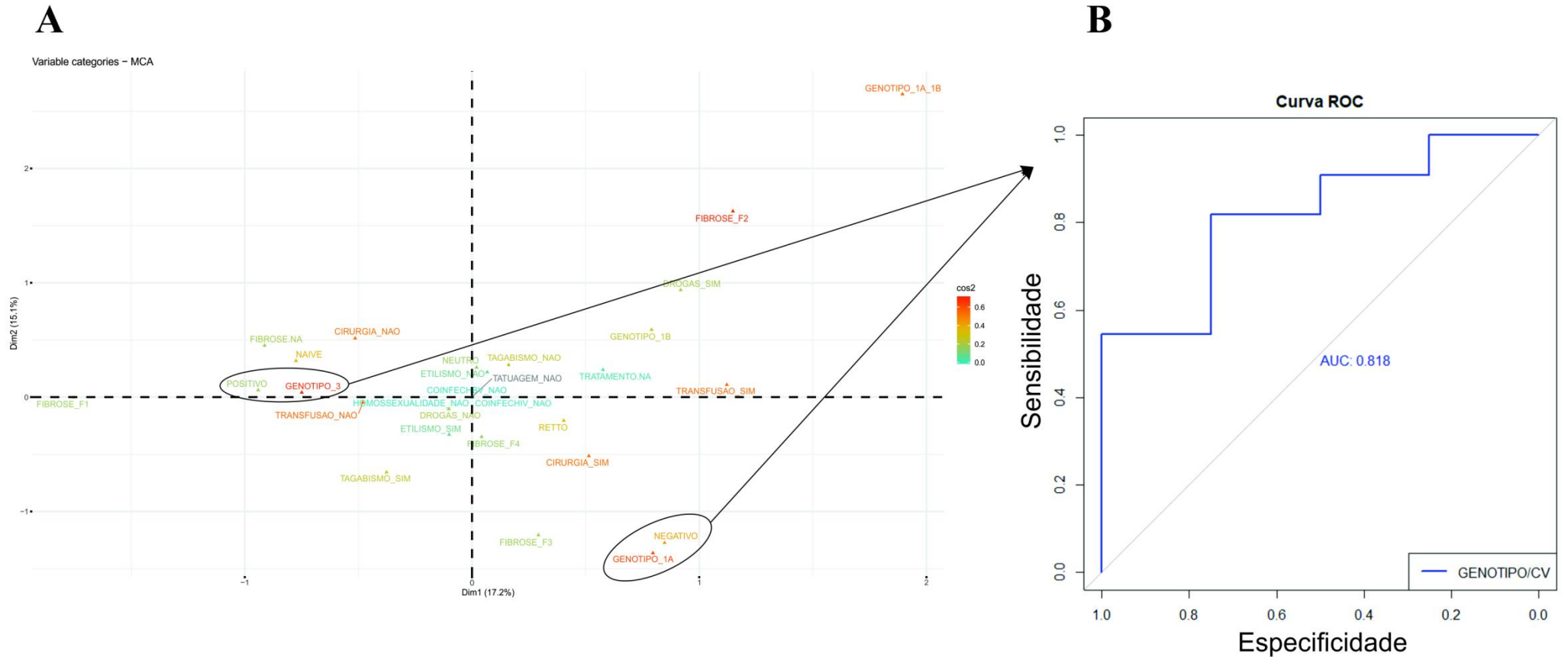
A aparente diferença citada acima (embora não significativa) encontrada entre os resultados das cargas virais (em UI/mL) entre os dois protocolos utilizados (MS e

MOD) levantou a possibilidade da ocorrência de correspondências quando consideradas as informações disponíveis nos prontuários clínicos e outros parâmetros laboratoriais. Com base nesta premissa, uma análise de correspondência múltipla (MCA - *Multiple Correspondence Analysis*) verificada pelo método ROC (*Receiver Operating Characteristic*) demonstrou haver uma relação entre o genótipo viral e o aumento e diminuição da carga viral nos pacientes. Para esta análise foi realizada uma subtração das cargas virais aferidas pelos protocolos MS e MOD e, quando a carga viral MS foi superior a carga viral MOD denominou-se parâmetro POSITIVO e, quando MS foi inferior a MOD o parâmetro foi dito NEGATIVO para efeito das análises.

Como mostrado na Figura 5, foi possível identificar dois *clusters* bem definidos, onde é possível estabelecer uma clara relação envolvendo dois parâmetros: no primeiro *cluster*, observa-se uma correspondência estatística entre o genótipo 3 e uma menor carga viral aferida pelo protocolo MOD em comparação com o protocolo MS, enquanto que, no segundo *cluster*, existe uma correspondência entre o genótipo 1A e uma maior carga viral aferida pelo protocolo MOD em comparação com o protocolo MS. Embora não tenha sido possível estabelecer outras correspondências estatísticas entre as cargas virais e os outros dados coletados nos prontuários clínicos dos pacientes, o genótipo viral parece, à primeira vista, ser capaz de influenciar a distribuição do VHC nos compartimentos extra-hepáticos.

Este achado levou à execução de um experimento piloto utilizando plasma VHC detectado para infectar *in vitro* plaquetas isentas de VHC. A incubação (plaquetas + VHC) foi realizada em três tubos contendo plaquetas, sendo que em cada tubo foi adicionado VHC de genótipo 1a, 1b e 3, respectivamente. Decorridas 48h de incubação plaquetas + VHC a carga viral foi determinada a partir do sobrenadante e no *pellet* de plaquetas. Observou-se que quando as plaquetas foram incubadas com vírus de genótipo 1a uma menor proporção do vírus ficou retida nas plaquetas quando comparado à incubação das plaquetas com vírus de genótipo 1b e 3. Estes resultados ainda são preliminares, uma vez que apenas duas replicatas de cada tubo foram realizadas. No entanto, é realmente provável que o VHC de genótipo 1a apresente maior dificuldade para interagir/internalizar nas plaquetas, o que ajudaria a explicar a diferença encontrada pelos protocolos MS e MOD. De qualquer forma, ainda não é possível explicar a razão pela qual o protocolo MOD foi

capaz de detectar uma carga viral maior do genótipo 1a do que o protocolo MS, quando o esperado seria uma proporção menor em virtude do número reduzido de plaquetas presentes no plasma. Porém, com base em todos os resultados apresentados, é possível sugerir que o genótipo viral é capaz de influenciar o resultado dos protocolos estudados, o que indica a realização de mais estudos futuros para confirmação do prognóstico de cada portador de Hepatite C e do melhor procedimento terapêutico a ser adotado em cada caso.



**Figura 5:** Diagrama da análise de correspondência múltipla (MCA) **(A)** e método ROC **(B)** referentes às cargas virais calculadas pelos protocolos MS e MOD e outros parâmetros relacionados aos pacientes estudados. As elipses destacam dois *clusters* que identificam correspondência estatística entre os parâmetros POSITIVO (determinado pela subtração das cargas virais aferidas pelos protocolos MS e MOD; neste caso, carga viral MS > carga viral MOD) e GENÓTIPO \_3 e os parâmetros NEGATIVO (determinado pela subtração das cargas virais

aferidas pelos protocolos MS e MOD; neste caso, carga viral MS < carga viral MOD) e GENÓTIPO\_1A. As correspondências estatísticas foram confirmadas pelo método ROC (*Receiver Operating Characteristic*) (AUC = 0,818).

*Conclusão*

Os resultados aqui apresentados nos permitem concluir que:

- ✓ para cargas virais a partir de 3,00 log o vírus ligado na plaqueta não impacta no resultado do exame de carga viral;
- ✓ na população estudada dados demográficos e clínicos não foram associados à carga viral;
- ✓ a interação/ligação do VHC com plaquetas parece depender do genótipo viral.

*Referências*

AMERICAN ASSOCIATION FOR THE STUDY OF LIVER DISEASES - AASLD. INFECTIOUS DISEASES SOCIETY OF AMERICA - IDSA. **Recommendations for testing, managing, and treating hepatitis C**. Danvers: AASLD, IDSA, 2017. Disponível em: <http://hcvguidelines.org/>. Acesso em: 21 out. 2018.

AGNELLO, V. et al. Hepatitis C virus and other Flaviviridae viruses enter cells via low density lipoprotein receptor. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 96, n. 22, p. 12766-12771, 1999. Disponível em: <https://www.pnas.org/content/96/22/12766>. Acesso em: 10 set. 2017.

ANJO, J. et al. O impacto da hepatite C em Portugal. **GE Jornal Português de Gastrenterologia**, v. 21, n. 2, p. 44-54, 2014. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0872817814000277>. Acesso em: 22 dez. 2018.

ARIEDE, J. R. et al. Platelets can be a biological compartment for the Hepatitis C Virus. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 46, n. 2, p. 627-629, 2015. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4507560/>. Acesso em: 10 abr. 2017.

ASSINGER, A. Platelets and infection: an emerging role of platelets in viral infection. **Frontiers in Immunology**, p. 10-12, 2014. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2014.00649/full>. Acesso em: 16 jun. 2018.

BALERIOLA, C. et al. Stability of Hepatitis C Virus, HIV, and Hepatitis B Virus nucleic acids in plasma samples after long-term storage at -20°C and -70°C. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 49, n. 9, p. 3163-3167, 2011. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3165594/pdf/zjm3163.pdf>. Acesso em: 22 dez. 2018.

BARTENSCHLAGER, R.; COSSET, F.-L.; LOHMANN, V. Hepatitis C virus replication cycle. **Journal of Hepatology**, v. 53, n. 3, p. 583-585, 2010. Disponível

em: [https://www.journal-of-hepatology.eu/article/S0168-8278\(10\)00474-5/abstract](https://www.journal-of-hepatology.eu/article/S0168-8278(10)00474-5/abstract).

Acesso em: 10 maio 2018.

BARTOLOME, J. et al. Hepatitis C virus replicates in peripheral blood mononuclear cells of patients with occult hepatitis C virus infection. **Gut**, v. 54, n. 5, p. 682-685, 2005. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1774478>.

Acesso em: 17 ago. 2018.

BARTOSCH, B.; COSSET, F. L. Cell entry of hepatitis C virus. **Virology**, v. 348, n. 1, p. 1-12, 2006. Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S004268220500841X?via%3Dihub>.

Acesso em: 15 set. 2018.

BARUT, S. et al. Thyroid dysfunction in Turkish patients with chronic hepatitis C receiving peginterferon plus ribavirin in the period of 2005-2010. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 16, n. 5, p. 448-451, 2012. Disponível em:

<http://www.scielo.br/pdf/bjid/v16n5/v16n5a08.pdf>. Acesso em: 7 jun. 2018.

BEDOSSA, P.; POYNARD, T. An algorithm for the grading of activity in chronic hepatitis C. The METAVIR Cooperative Study Group. **Hepatology**, v. 24, n. 2, p. 289-293, 1996. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8690394>.

Acesso em: 25 set. 2018.

BLANCHARD, E. et al. Hepatitis C Virus entry depends on clathrin-mediated endocytosis. **Journal of Virology**, v. 80, n. 14, p. 6964-6972, 2006. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1489042/>. Acesso em: 16 jul. 2018.

BRANDÃO, A. B. D. M. et al. Diagnóstico da hepatite C na prática médica: revisão da literatura. **Revista Panamericana de Salud Pública**, v. 9, n. 4, p. 161-168, 2001.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Políticas de Saúde. **Programa Nacional de Hepatites Virais**: avaliação da assistência as hepatites virais no Brasil. Brasília: Ministério da Saúde, 2002. Disponível em:

[http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/avaliacao\\_da\\_assistencia\\_hepatites\\_virais\\_no\\_brasil.pdf](http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/avaliacao_da_assistencia_hepatites_virais_no_brasil.pdf). Acesso em: 1 jun. 2017.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Hepatites virais: o Brasil está atento**. Brasília: Ministério da Saúde, 2007. 815 p. Disponível em:  
[http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/07\\_0044\\_M2.pdf](http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/07_0044_M2.pdf). Acesso em: 23 fev. 2017.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria da Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. **Inibidores de protease (Boceprevir e Telaprevir) para o tratamento da hepatite C crônica**. Brasília: Ministério da Saúde, 2012. Disponível em:  
[http://conitec.gov.br/images/Relatorios/2012/Boceprevir\\_Telaprevir\\_final.pdf](http://conitec.gov.br/images/Relatorios/2012/Boceprevir_Telaprevir_final.pdf). Acesso em: 15 dez. 2018.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria da Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Portaria nº 29, de 22 de Junho de 2015. Brasília: Ministério da Saúde, 2015b. Disponível em:  
[http://www.lex.com.br/legis\\_26922430\\_PORTARIA\\_N\\_29\\_DE\\_22\\_DE\\_JUNHO\\_DE\\_2015.aspx](http://www.lex.com.br/legis_26922430_PORTARIA_N_29_DE_22_DE_JUNHO_DE_2015.aspx). Acesso em: 20 fev. 2017.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Hepatites virais. **Boletim Epidemiológico**, v. 49, n. 31, p. 1-69, 2018a. Disponível em:  
[http://www.aids.gov.br/system/tdf/pub/2018/65812/boletim\\_hepatites\\_2018\\_sm\\_.pdf?file=1&type=node&id=65812](http://www.aids.gov.br/system/tdf/pub/2018/65812/boletim_hepatites_2018_sm_.pdf?file=1&type=node&id=65812). Acesso em: 21 dez. 2018.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais. **O manual técnico para o diagnóstico das hepatites virais**. Brasília: Ministério da Saúde, 2018b. 68 p. Disponível em:  
[http://www.aids.gov.br/sites/default/files/anexos/publicacao/2015/58551/manual\\_tecnico\\_hv\\_pdf\\_75405.pdf](http://www.aids.gov.br/sites/default/files/anexos/publicacao/2015/58551/manual_tecnico_hv_pdf_75405.pdf). Acesso em: 29 jul. 2018.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Prevenção e Controle das IST do HIV/Aids e das Hepatites Virais. **Protocolo clínico e diretrizes terapêuticas para a prevenção da transmissão**

**vertical de HIV, sífilis e hepatites virais.** Brasília: Ministério da Saúde, 2018c.

Disponível em: <http://www.aids.gov.br/publicacao/2015/protocolo-clinico-e-diretrizes-terapeuticas-para-hepatite-c-e-coinfecoes>. Acesso em: 30 jul. 2018.

BRASIL. Ministério da Saúde. Departamento de Vigilância, Prevenção e Controle das IST, do HIV/Aids e das Hepatites Virais. **Histórico das ações de hepatites virais.** Brasília: Ministério da Saúde, 2018d. Disponível em:

<http://www.aids.gov.br/pt-br/centrais-de-conteudos/historico-das-acoes-de-hepatites-virais>. Acesso em: 29 nov. 2018.

BURLONE, M. E.; BUDKOWSKA, A. Hepatitis C virus cell entry: role of lipoproteins and cellular receptors. **Journal of General Virology**, v. 90, p.1055-1070, 2009.

Disponível em:

<https://jgv.microbiologyresearch.org/content/journal/jgv/10.1099/vir.0.008300-0#tab2>.

Acesso em: 11 jan. 2017.

CASTILLO, I. et al. Hepatitis C virus replicates in peripheral blood mononuclear cells of patients with occult hepatitis C virus infection. **Gut**, v. 54, n. 5, p. 682-685, 2005.

Disponível em:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1774478/pdf/gut05400682.pdf>.

Acesso em: 15 fev. 2018.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL - CDC. **Viral hepatitis surveillance.** Atlanta: CDC, 2016. Disponível em:

<https://www.cdc.gov/hepatitis/statistics/2016surveillance/pdfs/2016HepSurveillanceRpt.pdf>. Acesso em: 10 dez. 2018.

CORMIER, E. G. et al. CD81 is an entry coreceptor for hepatitis C virus.

**Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America**, v. 101, n. 19, p. 7270–7274, 2004. Disponível em:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC409908/>. Acesso em: 10 set. 2017.

DA SILVA, A. et al. Hepatites virais: B, C e D: atualização. **Revista Brasileira de Clínica Médica**, v. 10, n. 3, p. 206-218, 2012. Disponível em:

[https://www.researchgate.net/publication/274722485\\_Hepatitis\\_virais\\_B\\_C\\_e\\_D\\_at\\_ualizacao](https://www.researchgate.net/publication/274722485_Hepatitis_virais_B_C_e_D_at_ualizacao). Acesso em: 3 fev. 2018.

DONATO, F. et al. Alcohol and hepatocellular carcinoma: the effect of lifetime intake and hepatitis virus infections in men and women. **American Journal of Epidemiology**, v. 155, p. 323, 2002. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11836196>. Acesso em: 26 jan. 2018.

ESPÍRITO-SANTO, M. P. et al. Analysis of hepatitis C virus (HCV) RNA load in platelets of HCV-monoinfected patients receiving antiviral therapy. **Annals of Hepatology**, v. 12, n. 3, p. 373-379, 2013. Disponível em: [http://www.annalsofhepatology.com/revista/numeros/2013/04\\_133\\_v12n3\\_2013\\_AnalysisHepatitis.pdf](http://www.annalsofhepatology.com/revista/numeros/2013/04_133_v12n3_2013_AnalysisHepatitis.pdf). Acesso em: 21 out. 2018.

EVANS, M. J. et al. Claudin-1 is a hepatitis C virus co-receptor required for a late step in entry. **Nature**, v. 446, n. 7137, p.801-805, 2007. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17325668>. Acesso em: 10 set. 2017.

FARIAS, N. et al. Casos de Hepatite B e C notificados em adolescentes ao Sistema Nacional de Informação de Agravos do estado de São Paulo, de 2007 a 2010. **BEPA Boletim Epidemiológico Paulista**, v. 8, n. 93, p. 4-13, 2011.

FERREIRA, C. T.; SILVEIRA, T. R. Hepatites virais: aspectos da epidemiologia e da prevenção. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 7, n. 4, p. 473-87, 2004. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/rbepid/v7n4/10.pdf>. Acesso em: 17 jan. 2018.

FUJIWARA, K. et al. Investigation of residual hepatitis C virus in presumed recovered subjects. **Hepatology**, v. 57, n. 2, p. 483-491, 2013. Disponível em: <https://aasldpubs.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1002/hep.25921>. Acesso em: 7 ago. 2018.

GHANY, M. G. et al. Diagnosis, management, and treatment of hepatitis C: an update. **Hepatology**, v. 49, n. 4, p. 1335-1374, 2009. Disponível em:

<https://aasldpubs.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/hep.22759>. Acesso em: 15 dez. 2018.

GOWER, E. et al. Global epidemiology and genotype distribution of the hepatitis C virus infection. **Journal of Hepatology**, v. 61, n. 1, p. S45-S57, 2014. Disponível em: [https://www.journal-of-hepatology.eu/article/S0168-8278\(14\)00526-1/fulltext](https://www.journal-of-hepatology.eu/article/S0168-8278(14)00526-1/fulltext). Acesso em: 3 out. 2018.

HAMMERSTEAD, S. et al. Diabetes and hepatitis C: a two-way association. **Frontiers in Endocrinology**, v. 6, p. 1-29, 2015. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4568414/pdf/fendo-06-00134.pdf>. Acesso em: 5 ago. 2018.

JACKA, B. et al. Sequencing of the hepatitis C virus: a systematic review. **PLoS ONE**, v. 8, n. 6, p. e67073, 2013. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3694929/>. Acesso em: 14 out. 2018.

JACOBSON, I. M. et al. Manifestations of chronic hepatitis C virus infection beyond the liver. **Clinical Gastroenterology and Hepatology**, v. 8, n. 12, p. 1017-1029, 2010. Disponível em: [https://www.cghjournal.org/article/S1542-3565\(10\)00895-5/pdf](https://www.cghjournal.org/article/S1542-3565(10)00895-5/pdf). Acesso em: 10 maio 2018.

HAMAIA, S.; LI, C.; ALLAIN, J. The dynamics of hepatitis C virus binding to platelets and 2 mononuclear cell lines. **Blood**, v. 98, n. 8, p. 2293-2301, 2001. Disponível em: <http://www.bloodjournal.org/content/98/8/2293?sso-checked=true>. Acesso em: 21 jul. 2018.

HEDESTIERNA, M. et al. Cirrhosis, high age and high body mass index are risk factors for persisting advanced fibrosis after sustained virological response in chronic hepatitis C. **Journal of Viral Hepatitis**, v. 25, n. 7, p. 802–810, 2018. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1111/jvh.12879>. Acesso em: 22 jan. 2019.

KIM, C. W.; CHANG, K.-M. Hepatitis C virus: virology and life cycle. **Clinical and Molecular Hepatology**, v. 19, n. 1, p. 17, 2013. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3622851/>. Acesso em: 21 dez. 2017.

LERAT, T. et al. In vivo tropism of hepatitis C virus genomic sequences in hematopoietic cells: influence of viral load, viral genotype, and cell phenotype. **Blood**, v. 91, n. 10, p. 3841–3849, 1998. Disponível em: <http://www.bloodjournal.org/content/bloodjournal/91/10/3841.full.pdf>. Acesso em: 20 set. 2018.

LINDENBACH, B. D.; RICE, C. M. Unravelling hepatitis C virus replication from genome to function. **Nature**, v. 436, n. 7053, p. 933–938, 2005. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16107832>. Acesso em: 6 fev. 2018.

LIU, S. et al. Tight junction proteins claudin-1 and occludin control hepatitis C virus entry and are downregulated during infection to prevent superinfection. **Journal of Virology**, v. 83, n. 4, p. 2011–2014, 2009. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19052094>. Acesso em: 10 set. 2017.

MARTINS, T.; NARCISO-SCHIAVON, J.; SCHIAVON, L. Epidemiologia da infecção pelo vírus da hepatite C. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 57, n. 1, p. 107-112, 2011. Disponível em: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0104-42302011000100024&lng=en&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0104-42302011000100024&lng=en&nrm=iso). Acesso em: 1 dez. 2018.

MESSINA, J. P. et al. Global distribution and prevalence of hepatitis C virus genotypes. **Hepatology**, v. 61, n. 1, p. 77–87, 2015. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25069599>. Acesso em: 5 set. 2018.

MIAO, Z. et al. Regulated entry of hepatitis C virus into hepatocytes. **Viruses**, v. 9, n. 5, p. 100, 2017. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5454413/>. Acesso em: 15 fev. 2018.

MURPHY, D. et al. Hepatitis C virus genotype 7, a new genotype originating from central Africa. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 53, n. 3, p. 967–972, 2015. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25520447>>. Acesso em: 01 mar. 2017.

PARISE, E. R. 25 years of Hepatitis C. **Arquivos de Gastroenterologia**, v. 52, n. 1, p. 1–3, 2015. Disponível em: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0004-28032015000100001](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0004-28032015000100001). Acesso em: 1 mar. 2018.

PADOVANI, J. L. et al. **Detecção in vitro da hepatite C (VHC) em plaquetas provenientes de indivíduos não infectados expostas ao vírus**. 2010. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina de Botucatu, Botucatu, 2010. Disponível em: <http://hdl.handle.net/11449/87816>. Acesso em: 1 mar. 2017.

PADOVANI, J. L. et al. In vitro detection of hepatitis C virus in platelets from uninfected individuals exposed to the virus. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 46, n. 2, p. 154–155, 2013. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/rsbmt/v46n2/0037-8682-rsbmt-00-00-04.pdf>. Acesso em: 4 abr. 2017.

PAVAN, M. H. P. et al. Viral hepatitis in patients infected with Human immunodeficiency virus. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 7, n. 4, p. 253-261, 2003. Disponível em: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1413-86702003000400005](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1413-86702003000400005). Acesso em: 10 ago. 2018.

PENIN, F. et al. Structural biology of hepatitis C virus. **Hepatology**, v. 39, n. 1, p. 5–19, 2004. Disponível em: <https://aasldpubs.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/hep.20032>. Acesso em: 5 jul. 2018.

RICE, S. Understanding the hepatitis C virus life cycle paves the way for highly effective therapies. **Nature Medicine**, v. 19, n. 7, p. 837–849, 2014. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23836234>. Acesso em: 8 nov. 2018.

SCARSELLI, E. et al. The human scavenger receptor class B type I is a novel candidate receptor for the hepatitis C virus. **EMBO Journal**, v. 21, n. 19, p. 5017-5025, 2002. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12356718>. Acesso em: 10 set. 2017.

SCHAECHTER, M. **Encyclopedia of microbiology**. 3. ed. San Diego: Elsevier, 2009.

SCHECHTERLY, C. et al. Investigation of residual hepatitis C virus in presumed recovered subjects. **Hepatology**, v. 57, n. 2, p. 483–491, 2015. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4523271/pdf/nihms388198.pdf>. Acesso em: 13 set. 2018.

SIMMONDS, P. et al. Classification of hepatitis C virus into six major genotypes and a series of subtypes by phylogenetic analysis of the NS-5 region. **Journal of General Virology**, v. 74, p. 2391–2399, 1993. Disponível em: <https://jgv.microbiologyresearch.org/content/journal/jgv/10.1099/0022-1317-74-11-2391#tab2>. Acesso em: 7 fev. 2018.

SIMMONDS, P. et al. Consensus proposals for a unified system of nomenclature of hepatitis C virus genotypes. **Hepatology**, v. 42, n. 4, p. 962- 973, 2005. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16149085>. Acesso em: 18 abr. 2017.

SMITH, D. B. et al. Expanded classification of hepatitis C virus into 7 genotypes and 67 subtypes: Updated criteria and genotype assignment web resource. **Hepatology**, v. 59, n. 1, p. 318–327, 2014. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24115039>. Acesso em: 11 ago. 2018.

SOUZA, et al. HIV and hepatitis B virus co-infection: prevalence and risk factors. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 37, n. 5, p. 391-395,

2004. Disponível em: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0037-86822004000500004](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0037-86822004000500004). Acesso em: 11 ago. 2018.

STRAUSS, E. Hepatite C. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 34, n. 1, p. 69-82, 2001. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/rsbmt/v34n1/4321.pdf>. Acesso em: 15 abr. 2018.

SZABÓ, E. et al. Viral hepatitis: new data on hepatitis C infection. **Pathology Oncology Research**, v. 9, n. 4, p. 215–221, 2003. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14688826>. Acesso em: 03 out. 2018.

SWAN, T.; RAYMOND, D. **Hepatitis C virus (HCV) and HIV/HCV coinfection: a critical review of research and treatment**. New York: Treatment Action Group, 2004. v. 1, cap. 2, p. 44-46. Disponível em: <http://www.treatmentactiongroup.org/sites/default/files/HCV%20and%20HIV%20HCV%20Coinfection%20A%20Critical%20Review%20of%20Research%20and%20Treatment%20full.pdf>. Acesso em: 22 jun. 2018.

UENO, T. et al. Exposure-response analysis for efficacy of daclatasvir, asunaprevir, and beclabuvir combinations in HCV-infected patients. **Clinical Pharmacology in Drug Development**, p. 1–11, 2019. Disponível em: <https://accp1.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1002/cpdd.646>. Acesso em: 26 jan. 2019.

UMAR, M. et al. **Diagnóstico, tratamento e prevenção da hepatite C**. Milwaukee: World Gastroenterology Organisation, 2017. 34 p. Disponível em: <http://www.worldgastroenterology.org/UserFiles/file/guidelines/hepatitis-c-portuguese-2017.pdf>. Acesso em: 20 ago. 2018.

WATANABE, C. M. **Avaliação da infecção de megacariócitos e plaquetas pelo VHC e a influência na fisiopatologia da hepatite C**. 2016. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina de Botucatu, Botucatu, 2016. Disponível em:

[https://repositorio.unesp.br/bitstream/handle/11449/138765/watanabe\\_cm\\_me\\_bot\\_int\\_sub.pdf?sequence=4&isAllowed=y](https://repositorio.unesp.br/bitstream/handle/11449/138765/watanabe_cm_me_bot_int_sub.pdf?sequence=4&isAllowed=y). Acesso em: 8 jun. 2018.

WHITE, D. L.; RATZIU, V.; EL-SERAG, H. B. Hepatitis C infection and risk of diabetes: a systematic review and meta-analysis. **Journal of Hepatology**, v. 49, n. 5, p. 831–844, 2008. Disponível em:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2642971/pdf/nihms77532.pdf>. Acesso em: 20 out. 2018.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Hepatitis C fact sheets**. 2018. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/hepatitis-c>. Acesso em: 22 ago. 2018.

