

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 24/01/2019.



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

Nathália Almeida Souza Tancler

**Detecção do Vírus da Hepatite C (VHC) em megacariócitos
expostos *in vitro* ao vírus provenientes de indivíduos não
infectados**

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

Orientadora: Profa. Dra. Rejane Maria Tommasini Grotto
Coorientador: Prof. Dr. Paulo Eduardo de Abreu Machado

**Botucatu
2017**

Nathália Almeida Souza Tancler

Detecção do Vírus da Hepatite C (VHC) em
megacariócitos expostos *in vitro* ao vírus
provenientes de indivíduos não infectados

Dissertação apresentada à
Faculdade de Medicina,
Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”,
Campus de Botucatu, para
obtenção do título de Mestre em
Pesquisa e Desenvolvimento
(Biotecnologia Médica).

Orientadora: Profa.Dra. Rejane Maria Tommasini Grotto
Coorientador: Prof.Dr. Paulo Eduardo de Abreu Machado

Botucatu
2017

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM. DIVISÃO
TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Tancler, Nathália Almeida Souza.

Detecção do vírus da Hepatite C (VHC) em megacariócitos expostos *in vitro* ao vírus provenientes de indivíduos não infectados / Nathália Almeida Souza Tancler. - Botucatu, 2017

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

Orientador: Rejane Maria Tommasini Grotto

Coorientador: Paulo Eduardo de Abreu Machado

Capes: 20804008

1. Hepatite C. 2. Hepatite por vírus. 3. Megacariócitos.
4. Técnicas *in vitro*.

Palavras-chave: Infecção *in vitro*; Megacariócito; Vírus Hepatite C.

ATA DA DEFESA PÚBLICA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE NATHÁLIA ALMEIDA SOUZA TANCLER, DISCENTE DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PESQUISA E DESENVOLVIMENTO (BIOTECNOLOGIA MÉDICA), DA FACULDADE DE MEDICINA.

Aos 24 dias do mês de janeiro do ano de 2017, às 09:30 horas, no(a) Mini Auditório "Prof. Emérito Paulo Eduardo de Abreu Machado" - Divisão do Hemocentro - FM/Botucatu - Unesp, reuniu-se a Comissão Examinadora da Defesa Pública, composta pelos seguintes membros: Profa. Dra. REJANE MARIA TOMMASINI GROTO - Orientador(a) do(a) Depto. de Bioprocessos e Biotecnologia / FCA/Botucatu - Unesp, Prof. Dr. GIOVANNI FARIA SILVA do(a) Depto. de Clínica Médica / FM/Botucatu - Unesp, Profa. Dra. CARLA DOS SANTOS RICCARDI do(a) Depto. de Bioprocessos e Biotecnologia / FCA/Botucatu - Unesp, sob a presidência do primeiro, a fim de proceder a arguição pública da DISSERTAÇÃO DE MESTRADO de NATHÁLIA ALMEIDA SOUZA TANCLER, intitulada **Detecção *in vitro* do vírus da Hepatite C (VHC) em megacariócitos provenientes de indivíduos não infectados expostos ao vírus.** Após a exposição, a discente foi arguida oralmente pelos membros da Comissão Examinadora, tendo recebido o conceito final: APROVADA. Nada mais havendo, foi lavrada a presente ata, que após lida e aprovada, foi assinada pelos membros da Comissão Examinadora.

Rejane Marie S. Grotto

Profa. Dra. REJANE MARIA TOMMASINI GROTO

Giovanni Faria Silva

Prof. Dr. GIOVANNI FARIA SILVA

Carla Dos Santos Riccardi

Profa. Dra. CARLA DOS SANTOS RICCARDI

Dedicatória

Dedico este trabalho ao meu marido, Murilo Colino Tancler, por sempre me respeitar e incentivar na busca de todos meus objetivos profissionais, sem seu apoio e paciência, eu jamais os alcançaria.

Dedicatória

Dedico também, aos pacientes que lutam contra a Doença da Hepatite C e aos doadores de Medula Óssea que tornaram possível a realização deste trabalho.

Agradecimentos

- ❖ *Primeiro, agradeço a Deus por me dar saúde para levantar todos os dias e lutar pelos meus objetivos.*
- ❖ *Agradeço a minha orientadora, Profa. Dra. Rejane Maria Tomasini Grotto, pela grande oportunidade que me deu desde minha graduação, por confiar em mim e pela sua dedicação com seu trabalho.*
- ❖ *A Gabriela Boni Polí e Cristiane Nonato pela ajuda e paciência de tantas noites no laboratório, sem o apoio delas este trabalho não seria realizado e da forma sempre alegre que o fizeram.*
- ❖ *A Dra. Flávia Hebler Barbosa Trovão, por sempre me ajudar mesmo com seu tempo apertado para fazer o laboratório funcionar da melhor forma possível.*
- ❖ *Ao Ms. Leonardo Nazário de Moraes, pela paciência e disposição em sempre me ajudar com seu conhecimento, sua presença no laboratório só veio para enriquecer nossos trabalhos.*
- ❖ *A minha chefe, Ms. Cristina Rossetto, pelo incentivo em realizar meu Mestrado, sempre muito compreensiva com minhas aulas e horários.*
- ❖ *As minhas amigas Renata Zugaib, por me aguentar há tanto tempo e me escutar sempre e a Heloísa Sampaio e Aline Galvani, pelas palavras de incentivo nos momentos mais difíceis.*

❖ A todos funcionários da equipe do Laboratório de Rotinas Diagnósticas em Biologia Molecular do Hemocentro de Botucatu, Regina Célia, Maércio Alho e Sarita Barreto e as aprimorandas Francielle Martins e Caroline Nunes.

❖ A minha equipe de trabalho do Laboratório de Hematologia do Hemocentro, José Roberto, Marinalva e Lázara, pela compreensão e apoio para eu realizar este Mestrado, e a Dra. Lígia Niéro por me ajudar tanto com seu conhecimento e leitura de lâminas.

❖ A todos os funcionários do Hemocentro da Unesp de Botucatu por todos favores que contribuíram muito em realizar este trabalho.

❖ A equipe do Laboratório de Citometria de Fluxo pela parceira na realização deste projeto.

“Talvez não tenhamos conseguido fazer o melhor, mas lutamos para que o melhor fosse feito. Não somos o que devemos ser, nem somos o que iremos ser, mas graças a deus, não somos o que éramos.”

Martin Luther King

RESUMO

Embora as células alvo do Vírus da Hepatite C (VHC) sejam hepatócitos, o RNA do vírus já foi descrito em outros compartimentos extra-hepáticos como células dendríticas, linfócitos, macrófagos e plaquetas. Estas últimas, são responsáveis pelo carregamento do vírus no paciente infectado, e apesar da ausência do principal receptor associado à entrada do vírus nas células alvo, o CD81, o VHC é capaz de interagir com plaquetas depois de incubação *in vitro*. Ainda, o vírus carregado pela plaqueta apresenta uma maior estabilidade quando comparado ao vírus circulante no plasma, o que faz com que o vírus presente na plaqueta adquira considerável importância no curso da Hepatite C crônica, podendo funcionar como reservatório para o vírus. No entanto, pouco se conhece se a presença do vírus em plaquetas pode advir de uma prévia interação do vírus com as células precursoras da plaqueta na medula óssea, os megacariócitos. Assim, o presente estudo avaliou a presença do VHC em megacariócitos expostos, *in vitro*, ao VHC. Material excedente de doadores voluntários e saudáveis de medula óssea foi utilizado como fonte para o isolamento dos megacariócitos, os quais, foram incubados *in vitro* com 100.000UI/mL de VHC de genótipo 1 (39 horas; 5% de emissão de CO₂; homogeneização 3x/dia no mesmo horário). Depois da incubação, os megacariócitos foram isolados e submetidos a análise qualitativa e quantitativa buscando a presença do vírus. Os resultados do presente estudo demonstraram que o VHC pode interagir com megacariócito diretamente, embora isso não tenha ocorrido em todos os casos avaliados. Este resultado sugere que o vírus encontrado na plaqueta na circulação periférica pode advir da fragmentação do megacariócito, já infectado, além da interação direta com a plaqueta. Assim, a plaqueta poderia constituir um reservatório viral circulante, o qual ao passar pela circulação hepática poderia conduzir a reinfecção, liberando os vírus no hepatócito, produzindo nova infecção, criando um ciclo hepatócito-plaqueta-hepatócito, contribuindo para a persistência viral no paciente

infectado.

Palavras-chave: Vírus Hepatite C; Megacariócito; Infecção *in vitro*

ABSTRACT

Hepatocytes are the target cells of hepatitis C virus (HCV), but RNA virus has been described in other extrahepatic compartments such as dendritic cells, lymphocytes, macrophages and platelets. Platelets are responsible for carrying the virus in infected patient and, despite, the absence of the main receptor associated with the entry of the virus into the target cells, the CD81, HCV is able to interact with platelets after *in vitro* incubation. The virus carried by the platelet presents a greater stability when compared to the virus circulating in the plasma; contributes with the course of the chronic Hepatitis C and is able to function as reservoir for the virus. However, there are few studies about the presence of the virus in megakaryocytes, platelet precursor cells in the bone marrow. Then, the present study aimed to evaluate the presence of HCV in megakaryocytes from uninfected donors after an *in vitro* exposition to HCV. The excess material from bone marrow donation was used for the isolation of megakaryocytes, the megakaryocytes isolated were *in vitro* incubated with 100.000 IU / ml HCV genotype 1 (39 hours, 5% of CO₂ emission, 3 homogenizations per day at the same time). After incubation, the megakaryocytes were submitted by qualitative and quantitative analysis for the presence of the virus. The results demonstrated that HCV may directly interact with megakaryocytes, although this did not occur in all evaluated cases. This result suggests that the virus found in the platelet in the blood circulation may result from the fragmentation of the infected megakaryocyte besides the direct interaction with the platelet. Thus, the platelet could compose a circulating viral reservoir in the hepatic circulation; this could lead to reinfection and release the virus into the hepatocyte. Besides, this event could produce a new infection and result in a hepatocyte-platelet-hepatocyte cycle, which contributes to viral persistence in the infected patient.

Keywords: Hepatitis C Virus; Megakaryocyte; *In Vitro* Infection

Lista de Ilustrações

Figura 1 - Representação do VHC, evidenciando o RNA viral e as proteínas de envelope (E1 e E2).....	19
Figura 2 - Representação do genoma de VHC, evidenciando os genes codificadores das proteínas estruturais e não estruturais do VHC.....	20
Figura 3 - Modelo da entrada do VHC associada com lipoproteínas.....	24
Figura 4 - Megacariocitopoese – fases da diferenciação e características fenotípicas.	32
Figura 5 - Modelo da formação de plaquetas.	34
Figura 6 - Representação da metodologia utilizada.....	42
Figura 7 - Representação da metodologia utilizada (etapa final do experimento <i>in vitro</i>).....	43
Figura 8 - Gel de Agarose 2% das amostras provenientes do sobrenadante da última lavagem.	48
Figura 9 - Gel de Agarose 2% das amostras provenientes da incubação do Controle Negativo (Mks+PL VHC-).....	49
Figura 10 - Gel agarose 2% das amostras provenientes das amostras da incubação Teste (Mks+PL VHC+)	50
Figura 11 - Parte de um cromatograma obtido do sequenciamento da região genômica do HCV de genótipo 1.....	50

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Sequência dos primers utilizados para amplificação da região 5'UTR do genoma do VHC.....	45
Tabela 2 - Resultado da quantificação do RNA do VHC (carga viral) dos megacariócitos expostos in vitro ao VHC	51

Lista de Abreviaturas

BC: Controle Branco

BFU-Mk: Célula Unidade Formadora de Explosão (*Bursting*)
Megacariocítico

cDNA: DNA complementar

CD81: Tetraspanina, proteína de superfície celular

CEP: Comitê de Ética em Pesquisa

CLDN-1 ou CLDN: Claudina, proteína de junção

CN: Controle Negativo

CPDA-1: Anticoagulante citrato de sódio, fosfato, dextrose e adenina

DAA: *direct-acting antivira*, medicamento de ação direta

E1: Glicoproteína do envelope viral

E2: Glicoproteína do envelope viral

GP: Receptores Glicoproteicos

GPVI: Receptor de sinalização de plaquetas ativadas pelo colágeno

HCC: Hepatite C Crônica

HSC: Célula-tronco hematopoiética

HDL: Lipoproteína de alta densidade

HPA: *Human Platelet Antigens*, antígenos plaquetários humanos

HRV1: *Hypervariable Region 1 Segment*, segmento da região I de hipervariabilidade

HTAs: *Host Targeting-Agents*, medicamento de agente de direcionamento ao hospedeiro

IFN: Interferon

IL28B: Gene da interleucina 28

IRES: *Internal Ribosome Entry Site*, sítio de entrada interno do ribossomo

LDL: Lipoproteína de baixa densidade

LDL-R: Receptor de lipoproteína de baixa densidade

LEL: *Large Extracellular Loop*, maior laço extracelular

LVPs: Lipovirus

NAT: Detecção de ácidos nucleicos

NS1: Proteína não estrutural do vírus

NS2: Proteína não estrutural do vírus

NS3: Proteína não estrutural do vírus

NS4A: Proteína não estrutural do vírus

NS4B: Proteína não estrutural do vírus

NS5A: Proteína não estrutural do vírus

NS5B: Proteína não estrutural do vírus

MO: Medula Óssea

Mk ou Mks: Megacarócito ou Megacariócitos

Mk-HPP-CFC: Célula formadora de colônia com alto potencial proliferativo de megacariócito

Mk-VHC: interação do Vírus da Hepatite C com o megacarócito

OCLN: Ocludina, proteína de junção

OMS: Organização Mundial da Saúde

PCR: Reação em Cadeia Polimerase

Peg-IF/RBV: *Pegylated* IFN combinado com Ribavirina

PL: Plasma

PL VHC+: Plasma positivo para o Vírus da Hepatite C

PL VHC-: Plasma negativo para o Vírus da Hepatite C

PMkB: Células transicionais entre progenitoras proliferativas de megacariócitos e pós-mitose

Proplt: Proplaquetas

qRT-PCR: Reação em Cadeia Polimerase em tempo real precedida de uma etapa de transcrição reversa

RBV: Ribavirina

RE: Retículo Endoplasmático

RLT: Solução tampão para lise celular

RPMI: Solução tampão para Megacariócito

RT-PCR: Reação em Cadeia Polimerase de Transcrição Reversa

RVS: Resposta Viroológica Sustentada

SCP: Precursor comum pluripotente

SDM: Sistema de Demarcação de Membrana

SR-BI/Cla1 ou SR-BI: Receptor *Scavenger* tipo B classe I

TBE: Tampão com Tris-Borato 45mM/EDTA 1mM

TPO: Trombopoetina

UFC: Unidade Formadora de Colônias

UTR: *Untranslated Regions*, regiões não traduzidas do RNA do Vírus da Hepatite C

VLDL: Lipoproteína de muita baixa densidade

VHC: Vírus da Hepatite C

Sumário

1. INTRODUÇÃO.....	15
2. REVISÃO LITERÁRIA.....	18
2.1. Vírus da Hepatite C.....	18
2.1.1. Aspectos epidemiológicos	18
2.1.2 Classificação, estrutura, ciclo replicação e entrada do vírus na célula	18
2.1.3 Curso Clínico da Infecção pelo VHC.....	25
2.1.4 Diagnóstico do Vírus da Hepatite C	26
2.1.5 Tratamento Hepatite C.....	27
2.1.6 Manifestações extra-hepaticas relacionadas com Hepatite C ..	28
2.2 Megacariócitos	29
2.2.1 Hematopoese	29
2.2.2 Megacariocitopoese e Trombopoese.....	30
2.2.2.1 Fases	30
3.JUSTIFICATIVA.....	36
4.OBJETIVOS.....	37
5. CASOS AVALIADOS, MATERIAL E MÉTODOS.....	38
5.1 Casos Avaliados	38
5.2 Material	38
5.3 Metodologia e Experimentos.....	39
5.3.1 Isolamento dos Megacariócitos	39
5.3.2 Incubação <i>in vitro</i> dos Megacariócitos com o VHC.....	39
5.3.3 Processamento das amostras depois da incubação com o VHC	40
5.3.4 Análise Qualitativa	43
5.3.4.1 Extração de RNA do VHC (a partir do tubo com 180µL de amostra - Figura 7)	43
5.3.4.2 Reação em Cadeia da Polimerase precedida de Transcrição Reversa (RT-Nested-PCR)	44
5.3.4.3 Revelação do produto amplificado por eletroforese em gel de agarose.....	45

5.3.4.4 Comprovação da presença do vírus por sequenciamento automático	45
5.3.5 Avaliação do sobrenadante da última lavagem	46
5.3.6 Análise Quantitativa (a partir do tubo com 820µL de amostra - Figura 7)	46
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	47
6.1 Obtenção dos Megacariócitos e n amostral	47
6.2 Detecção do VHC no sobrenadante da última lavagem.....	47
6.3 Validação do experimento (Resultados obtidos nos controles negativos)	Erro! Indicador não definido.
6.4 Avaliação qualitativa dos megacariócitos incubados com o VHC ...	50
6.5 Avaliação Quantitativa da presença do RNA do VHC em megacariócitos depois da incubação com o VHC	51
7. CONCLUSÃO.....	56
8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	57

1. INTRODUÇÃO

A Hepatite C é uma doença hepática infecciosa e crônica causada pelo vírus denominado Vírus da Hepatite C (VHC) ou, do inglês, *Hepatitis C Virus* (HCV) (KOFF; DIENSTAG, 1995; LAUER; WALKER, 2001). A infecção pelo vírus é considerada um problema de saúde mundial, devido ao seu potencial de evolução para cirrose e carcinoma hepatocelular (STRAUSS, 2001; SZABÓ et al., 2003). A doença crônica ocorre na maioria das pessoas infectadas pelo vírus, e esta tornou-se a principal indicação de um possível transplante de fígado. A maioria dos infectados desconhece sua condição, o que torna o problema ainda mais sério (FOCACCIA; DE SOUZA, 2015). A infecção pelo VHC tende a ser persistente na maioria dos infectados, refletindo a inabilidade do sistema imunológico em gerar uma resposta antiviral efetiva (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI; 2012).

O vírus apresenta alta variabilidade genética e, embora essa variabilidade se faça presente em todo genoma, as regiões de maior variabilidade são as codificadoras do envelope (E1 e E2) o que leva a doença naturalmente persistente. Esta condição, contribui para o escape do sistema imunológico incluindo dos anticorpos neutralizantes. (FOCACCIA; DE SOUZA, 2015).

Uma vez diagnosticada a infecção, o clínico deve avaliar a necessidade de indicação de terapia antiviral. O principal objetivo da terapêutica na infecção pelo VHC é a obtenção de resposta virológica sustentada (RVS), ou seja, obtenção de níveis indetectáveis de RNA viral no plasma ou soro por seis meses após o final do tratamento (DHUMEAUX et al., 2003; LINDSAY, 2002). O impacto da infecção do VHC ao longo dos anos é altamente variável, levando de efeitos mínimos a cronicidade hepática, cirrose e até carcinoma hepatocelular. O desenvolvimento de testes diagnósticos para VHC tem contribuído com o entendimento da infecção e a introdução de terapias altamente efetivas com a diminuição progressiva dos efeitos adversos (CLOHERLY et al., 2015).

O VHC apresenta tropismo pelo tecido hepático. O ciclo de replicação do vírus tem início com a interação das glicoproteínas do envelope viral, E1 e E2 com um receptor na superfície celular, o CD81, uma tetraspanina, encontrada na membrana celular de alguns tipos celulares, inclusive em hepatócitos (FLINT et al., 2001). Esclarecer o mecanismo de entrada do VHC nas células alvo é difícil pois não existe modelo animal e sistema de cultura apropriados. Apesar disso, várias moléculas de

superfície celular são consideradas receptores ou co-receptores essenciais para a entrada do VHC nas células, dentre elas: a tetraspanina CD81 (PILERI et al., 1998), o receptor *scavenger* tipo B classe I (SR-BI/Cla1) (SCARSELLI et al., 2002), a claudina-1 (CLDN-1) (EVANS et al., 2007) e ocludinas (LIU et al., 2009). Além dessas, algumas glicosaminoglicanas também vêm sendo associadas à adesão e entrada do VHC nas células (AGNELLO et al., 1999; CORMIER et al., 2004). Outros estudos sugerem a participação de proteínas de adesão celular na entrada do VHC. No entanto, o mecanismo exato de entrada do vírus nas células permanece, ainda, desconhecido (BURLONE; BUDKOWSKA, 2009).

Embora as células alvo do VHC sejam os hepatócitos, existem relatos da presença do vírus em outras células humanas. Estudos mostraram que os linfócitos T e B (PAVIO; LAI, 2003), monócitos, macrófagos (MULLER et al., 1995), células dendríticas (NAVAS et al., 2002) e plaquetas já foram associados à presença do RNA do VHC (HERNANDEZ et al., 1998). Estudos apontam que por volta de 40 a 76% dos pacientes com Hepatite C Crônica (HCC) desenvolvem pelo menos uma das manifestações extra-hepática, tais como: fadiga, artralgia, neuropatia, complicações renais, crioglobulinemia, vasculite, mialgia, alterações metabólicas da glicose, lesões dermatológicas e plaquetopenia (PUCHNER; BERG; 2010). A plaquetopenia está presente em 64% dos pacientes com cirrose hepática e em 6% de não-cirróticos. Existem diversas hipóteses apontadas como indutores desse quadro de plaquetopenia, como: desequilíbrio na síntese de trombopoetina (TPO) em estágios avançados de fibrose, formação de auto-anticorpos dirigidos contra glicoproteínas plaquetárias e presença de RNA viral em plaquetas e megacariócitos (Mks), o que sugere a morte celular destas células (ALMEIDA et al., 2004; AFDHAL; MCHUTCHISON, 2007; EL-BARBARY et al., 2010; PUCHNER; BERG; 2010; PADOVANI et al., 2013).

Como já mencionado anteriormente, o principal receptor de superfície celular associado à entrada do VHC em suas células alvo e outros tipos celulares é o CD81 (HAMAIA, LI et al., 2001), proteína da superfamília das tetraspaninas, cujos membros normalmente formam complexos moleculares com as glicoproteínas da família das integrinas (BERDITCHEVSKI, 2001). No entanto, esta proteína (CD81) não é expressa em plaquetas (HAMAIA, LI et al., 2001), porém é expressa em MKs (MA, et al., 2001)

Assim, a hipótese deste trabalho é que avaliar se existe uma possível interação

do VHC com Mk (Mk-VHC), uma vez que já foi documentada a interação do vírus com plaquetas em pacientes infectados (PADOVANI et al., 2013).

7. CONCLUSÃO

- ✓ O VHC de genótipo 1 é capaz de interagir com o megacariócito, *in vitro*, embora isto não ocorra em 100% dos casos.
- ✓ Baixas concentrações de RNA do VHC foram encontradas nos megacariócitos depois da infecção *in vitro*.

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, K.A; LITCHTMAN A. H; PILLAI, S. *Imunologia Celular e Molecular*. In. _____. **Imunidade contra microorganismos**. 7. ed. Elsevier. Rio de Janeiro, 2012. p. 345 – 363.

AGNELLO, V.et al. Hepatitis C virus and other Flaviviridae viruses enter cells via low density lipoprotein receptor. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, USA, v.96, n.22, p.12766-12771, 1999.

AFDHAL, N. H.; MCHUTCHISON, J. G. Review article: pharmacological approaches for the treatment of thrombocytopenia in patients with chronic liver disease and hepatitis C infection. **Aliment. Pharmacol. Ther.**, v. 26, suppl. 1, p. 29-39, 2007.

ALMEIDA, A. J. et al. Hepatitis C virus-associate thrombocytopenia: a controlled prospective, virological study. **Ann. Hematol.**, v. 83, n. 7, p. 434-440, 2004.

ALTER, M. J. The epidemiology of acute and chronic hepatitis C. **Clin. Liver Dis.**, v.1, n.3, p. 559-568, 1997

ALTER, H. J. An unexpected link between HCV and platelets. **Inside Blood.**, v. 98, n. 8, p. 2291, 2001.

ALVARIZ, F.G. Hepatite C Crônica: aspectos clínicos e evolutivos. **Mod. Hepatol.**, v. 30, n. esp., p. 20-32, 2004.

ANDRE, P. et al. Characterization of Low- and Very-Low-Density Hepatitis C Virus RNA-containing particles. **Journal of Virology.**, v. 76, n. 14, p. 6919-6928, 2002.

ARIEDE, J. R. et al. Platelets can be a biological compartment for the Hepatitis C Virus. *Braz. J. Microbiol.*, v. 46, n. 2, p. 627-629, 2015.

ASSINGER, A. Platelets and infection – an emerging role of platelets in viral infection. **Front. Immunol.**, v. 5, p. 1-12, 2014.

BARTENSCHLAGER, R.; LOHMANN, V. Replication of hepatitis C virus. **J. Gen. Virol.**, v.14, n.2, p.241-254, 2000.

BARTENSCHLAGER, R.; LOHMANN, V.; PENIN, F, The molecular and structural basis of advanced antiral therapy for hepatitis C vírus infection. **Nat. Rev Microbiol.**, v. 11, n.7, p. 482-496, 2013.

BERDITCHEVSKI, F. Complexes of tetraspanins with integrins: more than meets the eye. **Cell.**, v.114, p.4143-4151, 2001.

BERGELSON, J. M.; SHEPLEY, M. P.; CHAN, B.M. et al. Identification of the integrin VLA-2 as a receptor for echovirus 1. **Science.**, v.255, n.5052, p.1718–1720, 1992.

BRASIL. Brasil: 2,4 milhões têm hepatite C sem saber. Brasília, 2009. Disponível em: <<http://www.sistemas.aids.gov.br/imprensa/Noticias.asp?NOTCod=55149>>. Acesso em: 25 set 2016.

BRASIL. Consenso sobre Hepatite C crônica da Sociedade Brasileira de Hepatologia. 2014. Brasília. Disponível em: <<http://sbhepatologia.org.br/pdf/consenso-sobre-hepatite-cronica.pdf>>. Acesso em: 25 set 2016.

BRASIL. Boletim epidemiológico de Hepatites Virais. 2016. Brasília. 2016. Disponível em: <http://www.aids.gov.br/sites/default/files/anexos/publicacao/2016/59121/boletim_hepatites_05_08_2016_pdf_96185.pdf>. Acesso em: 26 set 2016.

BRAZZOLI, M. et al. CD81 is the central regulation of cellular events required for hepatitis C virus infection of human hepatocytes. **J. Virol.**, v. 82. p. 8316-8329.

BROUDY, V. C. Stem Cell Factor and Hematopoiesis. **Blood.**, v. 90, n. 4, p. 1345-1364, 1997.

BURLONE, M.E.; BUDKOWSKA, A. Hepatitis C virus cell entry: role of lipoproteins and cellular receptors. **J. Gen. Virol.**, v.90, p.1055–1070, 2009.

CALLENS, N. et al. Basic residues in hypervariable region 1 of Hepatitis C Virus envelope glycoprotein E2 contribute to virus entry. **Journal of Virology.**, v. 79, n. 24, p. 15331-15341, 2005.

CAMPIOTO, S. et al. Geographic distribution of hepatitis C vírus genotype in Brazil. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 38, n.1, p. 41-49, 2005.

CLOHERTY, G. TALAL, A. COLLIER, K. et al. The role of serologic and molecular diagnostic assays in the identification and management of Hepatitis C Virus infection. **J. Clin. Microbiol.**, v. 54 (2), p. 265–273 (Manuscrito aceito em 09/Dezembro/2015).

CHEN, S. L; MORGAN, T. R. The natural history of Hepatitis C Virus (HCV) infection. **International Journal of Medical Sciences.**, v. 3, p. 47-52, 2006.

CHOO, Q. et al. Isolation cDNA clone derived from a blood-borne non-A non-B viral hepatitis genome. **Science.**, v. 244, p. 359-362, 1989.

COCQUEREL, L., VOISSET, C., DUBUISSON, J. Hepatitis C virus entry: potential receptors and their biological functions. *Journal of General Virology.*, v. 87, p. 1075-1084, 2006.

CORMIER, E.G. et al. CD81 is an entry coreceptor for hepatitis C virus. **Proc. Natl. Acad. Sci., USA**, v.101, n.19, p.7270–7274, 2004.

CORVINO, M.S. et al. Coinfecção HIV/VHC em pacientes de Botucatu e região. **Rev. Bras. Epidemiol.**, v. 10, n.4, p.537-543, 2007.

DE FRANCESCO, R. et al. Approaching a new era for hepatitis C virus therapy: inhibitors of the NS3-4 serine protease and the NS5B RNA-dependent RNA polymerase. **Antiviral Res.**, v.58, n.1, p.1-16. 2003.

DEUSTSCH, V. R.; TOMER, A. Megakaryocyte development and platelet production. **British Journal of Haematology.**, v. 134, p. 453-466, 2006.

DHUMEAUX, D.; MARCELLIN, P., LEREBOURS, E. Treatment of hepatitis C. The 2002 **French consensus Gut.**, v.52, n.12, p.1784-1787, 2003.

DOUGLAS, A. et al. In vitro establishment and characterization of a human Megakaryoblastic cell line. **Blood.**, v. 75, n. 6, p. 1252-1261, 1990.

DUBUISSON, J; COSSET, F-L. Virology and cell biology of the hepatitis C virus life cycle – An update. **Journal of Hepatology.**, v. 61, p. S3-S13, 2014.

EL-BARBARY, M. A. et al. Thrombocytopenia in patients with chronic hepatitis C: a possible role of HCV on platelet progenitor cell maturation. **Angiology.**, v. 61, n.3, p. 304-313, 2010.

EVANS, M.J. et al. Claudin-1 is a hepatitis C virus co-receptor required for a late step in entry. **Nature.**, v.446, p.801–805, 2007.

ERUSALIMSKY, J.D., MARTIN, J.F. Cellular model systems to study megakaryocyte differentiation. In: WATSON, S.P. & AUTHI, K.S. **Platelets – a practical approach**. 1.ed. New York: Oxford University Press Inc., p. 27-45, 1996.

FARIAS, M. G.; BIERMANN, M. B. Análise morfológica, imunofenotípica e molecular na identificação da leucemia megacariocítica aguda (LMA-M7). **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, v. 29, n. 4, p. 387-393, 2007.

FELD, J.J. et al. Sofosbuvir and Velpatasvir for HCV genotype 1,2,4,5 and 6 infection. **The New England Journal of Medicine.**, v. 373, n. 27, p. 2599-2607, 2015.

FLINT, M.; QUINN, E.R.; LEVY, S. In search of hepatitis C virus receptor(s). **Clin. Liver Dis.**, v.5, n.4, p.873-893, 2001.

FOCCACIA R; DE SOUZA, V. F. Tratado de Infectologia. In: VERONESI, R; FOCCACIA, R. **Hepatite C**. 5. ed. São Paulo: Atheneu, 2015. p. 317 – 325.

FURUSE, M. et al. Claudin-1 and -2: Novel integral membrane proteins localizing at tight junctions with no sequence similarity to Occludin. **Cell. Biol.** v. 141, p. 1539-1550, 1998.

GEDDIS, A. E. The regulation of proplatelet production. **Haematological, The Hematology Journal.**, v. 94, n. 6, p. 756-759, 2009.

GIBELLINI, D. et al. Effects of hman immunodeficiency virus on the erythrocyte and megakaryocyte lineages. **World Journal of Virology.**, v. 2, p. 9-101, 2013.

GOTTWEIN, J.M.; BUKH, J. Cutting the Gordian knot-deveploment and biological relevance of hepatitis C virus cell culture systems. **Adv. Virus Rev.**, v. 71, p.51-133, 2008.

GREBERLY, J. et al. The effects of female sex, viral genotype, and IL28B genotype on spontaneous clearance of acute Hepatitis C Virus infection. **Hepatology.**, v. 59, n. 1, p. 109-120, 2014.

GREVE, J. M. et al. The major human rhinovirus receptor is ICAM-1. **Cell.**, v.56, n.5, p.839–847, 1989.

HALLIDAY, J., KLENERMAN, J., BARNES, E. Vaccination for hepatitis C virus: clsing in on an evasive target. **Exp. Rev. Vac.**, v. 10, n.5, p. 659-672, 2011.

HAMAIA, S.;L.I, C.; ALLAIN, J.P. The dynamics of hepatitis C virus binding to platelets and 2 mononuclear cell lines. **Blood.**, v.98, n.8, p.2293-2300, 2001.

HAHN, T.; RICE, C. M. Hepatitis C Virus entry. **Journal of Biological Chemistry.**, v. 283, n. 7, p. 3689-3693, 2007.

HETT-PATEL, S. et al. The spectrin-based membrane skeleton stabilizes mouse megakaryocyte membrane system and is essential for proplatelet and platelet formation. **Blood.**, v. 118, n. 6, p. 1641-1652, 2011.

HERNANDEZ, F. et al. Autoimmune thrombocytopenia associated with hepatitis C virus infection. **Acta Haematol.**, v. 99, n.4, p.217-220, 1998.

HYNES, R.O. Integrins: Versatility, Modulation and Signalling in Cell Adhesion. **Cell.**, v.69, n.1, p.11-25, 1992.

HOFFBRAND, A. V., MOSS, P.A. H. Plaquetas, coagulação do sangue e hemostasia. In: _____. **Fundamentos da Hematologia**. Porto Alegre: Artmed, 2013, cap. 24, p. 314-327.

HOFFMAN, R. BRUNO, E. Human megakaryocyte progenitor cells. **Semin. Hematol.**, v. 35, p. 183-191, 1998.

KEDIA, S. et al. Benign and malignant hematological manifestations chronic Hepatitis C Virus infection. *Int. J. Prevent. Med.*, v. 5, suppl. 3, p. S179-S192, 2014.

KRIEGER, M. Charting the fate of the “good cholesterol” identification and characterization of the high-density lipoprotein receptor SR-BI. **Annu Rev Biochem.**, v. 68. p. 523-558, 1999.

KOFF, R.S.; DIENSTAG, J.L. Extrahepatic manifestations of hepatitis C and the association with alcoholic liver disease. **Semin. Liver Dis.**, v.15, p.101-109, 1995.

LANDI, E. P.; MARQUES JUNIOR, J. F. M. Caracterização da ativação plaquetária nos concentrados de plaquetas por citometria de fluxo. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, n. 25, v. 1, p. 39-46, 2003.

LAUER, G.M.; WALKER, B.D. Hepatitis C virus infection. **N. Engl. J. Med.**, v.345, n.1 p.41-52, 2001.

LINDENBACH, B.D.; RICE, C.M. Unravelling hepatitis C virus replication from genome to function. **Nature.**, v.436, p.933-938, 2005.

LINDSAY, K.L. Introduction to therapy of hepatitis C. **Hepatology.**, v.36, p.114-120, 2002.

LIU, S. et al. Tight junction proteins claudin-1 and occludin control hepatitis C virus entry and are downregulated during infection to prevent superinfection. **J. Virol.**, v.83, n.4, p.2011–2014, 2009.

LONG, M. W. Megakaryocyte Differentiation Events. **Semin. Hematol.**, v. 35, p. 192-199, 1998.

MA, F. et al. Development of human lymphohematopoietic stem and progenitor cells defined by expression of CD34 and CD81. **Blood.**, v. 97, n. 12, p. 3755-3762, 2001.

MACHADO, J. R.; FONSECA, J. E. Avaliação do Papel do Antígeno Plaquetário Humano 2 (HPA-2) em Plaquetas Expostas ao Vírus da Hepatite C (HCV) *In Vitro*. **Anais 9º Simpósio de Ensino de Graduação: Unimep**, nov, 2011.

MACHLUS, K. R.; ITALIANO-JR, J. E. The incredible journey: from megakaryocyte development to platelet formation. **J. Cell Biol.**, v. 201, n. 6, p. 785-796, 2013.

MADDON, P.J. et al. The T4 gene encodes the AIDS virus receptor and is expressed in the immune system and the brain. **Cell.**, v.47, n.3, p.333-348, 1986.

METACALFE, P. et al. Nomenclature of human platelet antigens. **Vox Sang.**, v. 85, n. 3, p. 240-245, 2003.

MICALLEF, J. M ; KALDOR, J. M ; DORE, G. J. Spontaneous viral clearance following acute hepatitis C infection: a systematic review of longitudinal studies. **J Viral Hepat.**, v. 41, p. 34-41, 2006.

MORADPOUR, D., PENIN, F., RICE, C.M. Replication of hepatitis C virus. **Nat. Rev Microbiol.**, v.5, n.6, p. 453-463, 2007.

MULLER, H.M. et al. Peripheral blood leukocytes serve as a possible extrahepatic site for hepatitis C virus replication. **J. Gen. Virol.**, v.74, n.4, p.669-676, 1995.

MURATA, S. et al. Signal transduction of platelet-induced liver regeneration and decrease of liver fibrosis. **Int. J. Mol. Sci.**, v. 15, n. 4, p.5412-5425, 2014.

MURPHY, D.G. et al. V3 region polymorphism in HIV-1 from Brazil: prevalence of subtype B strains divergent from North American/European prototype and detection of subtype F. **AIDS Res. Hum, Retrovirus**, v. 10, n. 5, p. 569-576, 2007.

NAVARRO, S. et al. Interleukin-6 and its receptor are expressed by human megakaryocyte: in vitro effects on proliferation and endoreplication. **Blood.**, v. 77, p. 461-471, 1991.

NAVAS, M. C. et al. Dendritic cell susceptibility to hepatitis C virus genotype 1 infection. **J. Med. Virol.**, v.67, n.2, p.152-161, 2002.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAUDE (OMS). Guideline for the screening, care and treatment of persons with chronic hepatitis C infection. Updated version April 2016. Disponível em: <<http://www.who.int/hepatitis/publications/hepatitis-c-guidelines-2016/en/>>. Acesso em: 25 set.2016.

PADOVANI et al. In vitro detection of hepatitis C virus in platelets from uninfected individuals exposed to the virus. **Re. Soc. Bras. Med. Trop.** v. 46, p. 154-155, 2013

PAVIO, N.; LAI, M. M. The hepatitis C virus persistence: how to evade the immune system? **J. Biosci.**, v.28, n.3, p.287–304, 2003.

PAWLOTSKY, J-M. New Hepatitis C Therapies: The toolbox, strategies, and challenges. **Gastroenterology.**, v. 146, p. 1176–1192, 2014.

PENG, B.H., LEE, J.C., CAMPBELL, G.A. In vitro protein complex formation with cytoskeleton-anchoring domain of occluding identification by limited proteolysis. **J. Biol. Chem.**, v. 278. p. 49644-49651, 2003.

PENIN, F. et al. Structural biology of hepatitis C virus. **Hepatology.**, v.39, p.5-19, 2004.

PETIT, M.A. et al. Cell surface expression of LDL receptor in chronic Hepatite C correlation with viral load. **Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.**, v. 336. p. E416-E420, 2007.

PETRACCA, R. et al. Structure-Function analysis of Hepatitis C Virus envelope-CD81 binding. *Journal of Virology.*, v. 74, n. 10, p. 4824-4820, 2000.

PILERI, P. et al. Binding of Hepatitis C Virus to CD81. **Science.**, v.282, n.5390, p.938-941, 1998.

PUCHNER, K. P.; BERG, T. Extrahepatic manifestations. In: MAUSS, S. et al. **Hepatology: a clinical handbook**. Düsseldorf: Flying publisher, 2010, p. 239-255

RADKOWSKI, M. et al. Detection of active hepatitis C virus aand hepatitis G virus/GB virus C replication in bone marrow in human subjects. **Blood.**, v. 95, n. 12. P. 3986-3989, 2000.

RICE, C. M, LINDENBACH, B. D. Unravelling hepatitis C virus replication from genome to function. **Nature.**, v.436, p.933-938, 2005.

ROBERTSON, B.; MYERS, G.; HOWARD, C. et.al. Classification, nomenclature, and database development for hepatitis C virus (HCV) and related viruses: proposals for standardization. **International Committee on Virus Taxonomy. Arch. Virol.**, v.143, n.12, p.2493-2503, 1998.

ROCKEY, D.C.; FRIEDMAN, S.L. Hepatic fibrosis and cirrhosis. In **T.D. Boyer.**, v. 55, p. 87-109, 2006.

ROMANO, et al. A base molecular da resistência dos medicamentos contra o vírus da Hepatite C NS3/ 4A inibidores de protease. **PLoS Pathogens.**, p. 1-13, 2012.

ROMANOS, M.T.V.; SANTOS, N.S.O; WIGG, M.D. Introdução a virologia humana. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 144, 2002.

ROSEN, H.R.; GRETCH, D.R. Hepatitis C virus: current understanding and prospects for future therapies. **Mol. Med.Today.**, v.5, n.9, p.393-399, 1999.

RUDENKO, G; DEISENHOFER, J. The low-density lipoprotein receptor: ligands, debates and more. **Curr. Opin Struct. Biol.**, v. 13, p. 683-689. 2003

RUGGERI, Z. M. Mechanism initiating platelet thrombus formation. **Thromb. Haemost.**, v. 78, p. 611-616, 1997.

RUGGERI, Z. M. Platelets in atherothrombosis. **Nat. Med.**, v. 8, p. 1227-1234, 2002.

SANSONNO, D. et al. Hepatitis c virus infection involves Cd34+ hematopoietic progenitor cells in hepatitis C virus chronic carriers. **Blood.**, v. 92, p. 3326-3337, 1998.

SCARSELLI, E. et al. The human scavenger receptor class B type I is a novel candidate receptor for the hepatitis C virus. **EMBO J.**, v.21, n.19, p.5017-5025, 2002.

SCHROEDER, M. L; RAYNER, H. L. Red cell, platelet and white cell antigens. In: LEE, G. R. et al. **Wintrobe's clinical hematology**. 9. ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1993. p. 616-650.

SELVARAJAH, S; BUSCH, M.P. Transfusion-Transmission of HCV, a long but successful road map to safety. **Antivir. Ther.**, v. 17, p. 1423-1429, 2012.

SHELDON, J. et al. Increased replicative fitness can lead to decreased drug sensitivity of Hepatitis C Virus. **Journal of Virology**, v. 88, n. 20, p. 12098-12111, 2014.

SIMMONDS, P. Variability of the hepatitis C virus genome. **Curr.Stud.Hematol. Blood Transfus.**, n.62, p.38-63, 1998.

SIMMONDS, P. et al. Consensus proposals for an united system of nomenclature of hepatitis C virus genotype. **Hepatology**, v. 42, p. 962-973, 2005.

STAUTON, D.E. et al. A cell adhesion molecule, ICAM-1, is the major surface receptor for rhinoviruses. **Cell.**, v.56, n.5, p.849-853, 1989.

STRAUSS, E. Hepatite C. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v.34, n.1, p.69-82, 2001.

SZABÓ, E. et al. Viral hepatitis: new data on hepatitis C infection [review]. **Pathol. Oncol .Res.**, v.9, n.4, p.215–221, 2003.

TANG, H., GRISE, H. Cellular and molecular biology of HCV infection and hepatitis. **Clin. Sci.**, v. 117, n.2, p. 49-65, 2009.

VOISSET, C. et al. High density lipoproteins facilitate Hepatitis C Virus entry through the Scavenger Receptor Class B Type I. **The Journal of Biology Chemistry**. v. 280, n. 9, p. 7793-7799, 2005.

WATANABE, C.M. **Avaliação da infecção de megacariócitos e plaquetas pelo VHC e a influencia na fisiopatologia da hepatite C**. 2016. 81f. Dissertação (Mestrado)-Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2016.

WICKENHAUSER, C. et al. Secretion of cytokines (Interleukins-1 α , -3, and -6 and granulocyte-macrophage Colony Stimulating Factor) by normal human bone marrowmegacaryocytes. **Blood.**, v. 85, p. 685-691, 1995.

WICKHAM, T.J. et al. Integrins alpha v beta 3 and alpha v beta 5 promote adenovirus internalization but not virus attachment. **Cell.**, v.73, n.2, p.309–319, 1993.

WUNSCHMANN, S. et al. Characterization of hepatitis C virus (HCV) and HCV E2 interactions with Cd81 and the low-density lipoprotein receptor. **J. Virol.**, v. 74, n. 21, p. 10055-10062, 2000.

ZAHN, A. et al. Hepatitis C virus interacts with human platelets glycoprotein VI. **J. Gen. Virol.**, v. 87, p. 2243-2251, 2006.

ZEISEL, M. B. et al. Host targeting agents to prevent and cure Hepatitis C virus infection. **Viruses.**, v. 7, p. 5956-5685, 2015.

ZHU, Y. Z. et al. How Hepatitis C invades hepatocytes: the mystery of viral entry. **World J. Gastroenterol.**, v. 20, n. 13, p. 3457-3467, 2014.

ZON, L.I. Developmental Biology of Hematopoiesis. **Blood.**, v. 86, n. 8, p. 2876-2891, 1995.