

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO" - UNESP  
FACULDADE DE MEDICINA DE BOTUCATU  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FISIOPATOLOGIA EM CLÍNICA MÉDICA

Camila Fernanda Verdichio de Moraes

**ANTÍGENOS PLAQUETÁRIOS HUMANOS (HPA) EM  
PORTADORES DO VÍRUS DA HEPATITE C (HCV)**

Botucatu  
2009

Camila Fernanda Verdichio de Moraes

# **ANTÍGENOS PLAQUETÁRIOS HUMANOS (HPA) EM PORTADORES DO VÍRUS DA HEPATITE C (HCV)**

Tese apresentada ao curso de Pós-Graduação em Fisiopatologia em Clínica Médica da Faculdade de Medicina de Botucatu-UNESP, para obtenção do título de Doutor em Fisiopatologia em Clínica Médica.

Orientadora: Dra. Maria Inês de Moura Campos Pardini

Co-orientador: Dr. Giovanni Faria Silva

Botucatu  
2009

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO DA  
INFORMAÇÃO  
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP  
*Bibliotecária responsável: Selma Maria de Jesus*

Moraes, Camila Fernanda Verdichio de.

Antígenos plaquetários humanos (HPA) em portadores do vírus da Hepatite C (HCV) / Camila Fernanda Verdichio de Moraes. – Botucatu : [s.n.], 2009.

Tese (doutorado) – Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, 2009.

Orientadora: Maria Inês de Moura Campos Pardini

Co-orientador: Giovanni Faria Silva

Assunto CAPES: 40105008

1. Hepatite C 2. Hepatite por vírus 3. Vírus da Hepatite C

CDD 616.3623

Palavras chave: Antígenos plaquetários humanos; Fibrose hepática; Plaquetas; Vírus da hepatite C

## DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho...

À minha tia **Delara** e minha mãe **Vita**, que me apoiaram e caminharam ao meu lado me amparando por todos esses anos, me ajudando a consertar os erros e rindo comigo nos acertos. Amo vocês.

Aos meus avós **Romeu** e **Olívia** (*in memoriam*), eles ensinaram que a única coisa que não poderiam me tirar na vida seria o conhecimento.

## **AGRADECIMENTOS**

- A Deus que sempre se fez presente em minha vida, me guiando e direcionando pelo caminho mais correto a seguir;
- À minha orientadora Profa. Dra. Maria Inês de Moura Campos Pardini, pela oportunidade de fazer parte de seu grupo e pelos ensinamentos;
- Ao meu co-orientador Prof. Dr. Giovanni Faria Silva, pelos importantes ensinamentos na área clínica, por estar sempre disposto a me auxiliar, pela paciência e compreensão em todos os momentos, mas principalmente pelo grande apoio e incentivo e por ser este profissional que eu tanto admiro;
- Ao Programa de Pós-Graduação “Fisiopatologia em Clínica Médica” da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP;
- Aos docentes do Programa de Pós-Graduação pelos ensinamentos;
- Ao Prof. Dr. Carlos R. Padovani e Prof. Dr. José Eduardo Corrente, pela assistência dada nas análises estatísticas;
- Ao Dr. Paulo Eduardo de Abreu Machado, pelos preciosos ensinamentos e conselhos;
- À Profa. Dra. Elaine Sbroggio de Oliveira Rodini, que foi responsável pelos meus primeiros passos na pesquisa e que sempre me tratou com muito carinho e atenção;
- À equipe dos ambulatórios “Hepato-Hemocentro” e “Peguilado”, em especial Mari, Dr. Fernando, Natália, Cláudia e Rodriguinho, que auxiliaram muito a minha relação com os pacientes e sempre estiveram prontos a ajudar;
- A todos aqueles que estão atualmente ou já passaram pelo laboratório de Biologia Molecular do Hemocentro: Elisabete (Betinha), Adriana, Denise, Juliano, Juliana (Toxa), Lucia, Paula, Rosana, Marcinha, Kamila e Luciana. Vocês foram uma companhia muito agradável nesses cinco anos, muito obrigada pela força e pela amizade;

- À Dra. Rejane Maria Tommasini Grotto, obrigada pela atenção, dedicação e paciência durante esses anos;
- Às minhas queridas amigas Juliana e Marina. São 10 anos juntas, entre graduação, estágios, pós-graduação, viagens, mas principalmente companheirismo e amizade. Obrigada por estarem sempre ao meu lado;
- Às minhas grandes amigas e companheiras de Laboratório Chiara e Patrícia. Não sei se conseguiria terminar esse trabalho sem a ajuda e a divertida companhia de vocês;
- À minha amiga Priscila, que mesmo estando longe sempre me incentivou a continuar e nunca desistir desse sonho. Admiro muito você, nossa parceria de graduação nunca vai terminar;
- Aos funcionários da equipe do Laboratório de Rotina Diagnósticas em Biologia Molecular do Hemocentro: Silvia, Maércio, Regina, Rosângela e Rita. Obrigada pelo auxílio com as amostras e com os exames;
- Às minhas queridas companheiras de viagem: Ana Paula, Graziela, Maira, Paulinha e Ana Cláudia. Vocês foram meu porto-seguro no trajeto Bauru-Botucatu, nossas risadas e nossas reuniões são inesquecíveis. Obrigada pela amizade e pelo incentivo;
- À minha *designer* preferida Danielle de Almeida Pacheco Thomaz (Dani), pela arte maravilhosa da tese e pelo constante apoio;
- Ao meu tio Ozir e Edinel, obrigada pelas prazerosas reuniões de família juntamente com minha tia De e minha mãe Vita. Vocês ajudam a recarregar minhas forças pra seguir em frente e me dão a segurança necessária;
- A todos os professores, funcionários e queridos alunos da escola E. E. Prof. José Celso de Mello, representados pelo Diretor Nelson, Vice-Diretora Adalberi e as Coordenadoras Fernanda e Nancy. A convivência com vocês nesses três anos facilitou muito minha vida em Tatuí e a conclusão desse trabalho. Obrigada por me ajudarem e sempre estarem dispostos a oferecer uma palavra amiga;
- À minhas queridas companheiras da escola Denise e Sandra e minhas amigas de Tatuí Leiliana e Cristiane. Vocês foram muito importantes no

meu primeiro ano em Tatuí e continuam se fazendo presentes pelas risadas, companheirismo e principalmente pelo apoio que sempre demonstram;

- Às minhas companheiras de viagem para Tatuí: Fabiana, Mônica e Flávia. Obrigada pelo incentivo, pelas conversas agradáveis e pela amizade;
- Aos funcionários da Seção de Pós-Graduação, especialmente Nathanael e Regina, pela paciência, disponibilidade e atenção com que sempre me trataram;
- Às queridas funcionárias do Hemocentro Janisse e Cléo pela constante ajuda e pelas palavras amigas em todas as horas;
- Aos meus queridos "tios" Jorge e Eliana. Vocês começaram comigo no início da minha graduação, sempre me apoiando de todas as formas possíveis e me incentivando a continuar. Obrigada por tudo;
- E finalmente, a todos os pacientes do Ambulatório de Hepatites que carinhosamente participaram dessa pesquisa e com quem eu tanto aprendi.

## **EPÍGRAFE**

**“O correr da vida embrulha tudo, a vida é assim: esquenta e esfria, aperta e daí afrouxa, sossega e depois desinquieta. O que ela quer da gente é coragem”**

*Guimarães Rosa*



## **PREFÁCIO**

*O estudo dos Antígenos Plaquetários Humanos (Human Platelets Antigens - HPA) em pacientes portadores do vírus da hepatite C (HCV) é uma abordagem inédita e por isso extremamente intrigante.*

*Bióloga de formação, iniciei meu mestrado nesse tema e tendo em mãos os primeiros resultados promissores, optamos pela realização do doutorado direto (DD), transformando o trabalho de mestrado numa **linha de pesquisa** a ser seguida durante os próximos anos. A cada nova hipótese, uma nova análise foi realizada, numa sucessão de trabalhos, ainda longe de ser concluída... Mas, prazos são estabelecidos e é preciso formalizar a conclusão do doutorado.*

*Considerando o caráter contínuo da linha de pesquisa, o modelo escolhido para apresentação dessa tese foi uma sucessão de artigos, na fase em que cada um deles se encontra nesse momento.*

*O **capítulo I**, com informações gerais sobre o Vírus da Hepatite C e os Antígenos Plaquetários Humanos, foi anexado como introdução com o intuito de familiarizar os leitores ao tema abordado, facilitando a leitura dos artigos.*

*O **capítulo II** "Allelic frequencies of HPA-1 to 5 human platelet antigens in infected with hepatitis C" é um artigo já **publicado** no periódico "Journal of Medical Virology", qualis A internacional, fator de impacto 2.831.*

*O **capítulo III** "Human Platelet Antigens-1, -3, -4 and -5 and liver fibrosis in HCV-infected patients" é um artigo que será submetido para publicação no periódico "Tissue Antigens".*

O **capítulo IV** "Associação entre HPA-1, -3, -4 e -5 e a resposta ao tratamento em pacientes infectados pelo Vírus da Hepatite C" é um artigo que, após as discussões realizadas no momento da defesa, será revisto e traduzido visando futura publicação em uma revista a ser escolhida.

O **capítulo V** relata o trabalho "Viral Genetic Diversity Network - VGDN" e a dissertação de mestrado "Análise comparativa das metodologias de hibridização reversa e seqüenciamento direto para a genotipagem do Vírus da Hepatite C" que durante o doutorado tive oportunidade de participar como colaboradora.

Em **Anexo** está disponibilizada uma tabela com os dados brutos coletados durante esse projeto, os quais poderão ser utilizados pelos membros da banca para suas análises, bem como para futuros trabalhos.

Camila Fernanda

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Estrutura do Vírus da Hepatite C (Adaptado de <a href="http://www.duke.edu/~sbrad">www.duke.edu/~sbrad</a> ) .....	<b>16</b>
<b>Figura 2:</b> Genoma do HCV e processamento da poliproteína precursora (Adaptado de <a href="http://www.seimc.org/control/revi_viro/variaVHC.htm">www.seimc.org/control/revi_viro/variaVHC.htm</a> ) .....	<b>17</b>
<b>Figura 3:</b> Proteínas do HCV e locais de clivagem (Adaptado de Moradpour et al., 2007).....	<b>17</b>
<b>Figura 4:</b> Árvore filogenética dos genótipos e subtipos do HCV (Adaptado de Simmonds et al., 2005) .....	<b>18</b>
<b>Figura 5:</b> Complexo glicoprotéico GPIa/IIa presente nas membranas plaquetárias (Adaptado de Santoro & Zutter, 1995) .....	<b>24</b>
<b>Figura 6:</b> Complexo glicoprotéico GPIIb/IIIa presente nas membranas plaquetárias (Adaptado de Bachelot et al., 1995) .....	<b>25</b>
<b>Figura 7:</b> Complexo glicoprotéico GPIb/IX/V presente nas membranas plaquetárias (Adaptado de <a href="http://www.nibsc.ac.uk/aboutus/platelets.asp?id=31">www.nibsc.ac.uk/aboutus/platelets.asp?id=31</a> ) .....	<b>26</b>

## LISTA DE TABELAS

<b>Capítulo II</b> .....	<b>38</b>
Table I: Allelic and genotypes frequencies for HPA-1 to -5 in infected with HCV (n=191) compared with control group (n=257), $p < 0.05$ .....	42
<b>Capítulo III</b> .....	<b>47</b>
Table I: Allelic and genotypic frequencies of the HPA-1, -3 and -5 systems in Group 1 (n=102) and Group 2 (n=73), $p < 0.05$ .....	51
<b>Capítulo IV</b> .....	<b>58</b>
Tabela 1: Freqüências alélicas e genotípicas dos sistemas HPA-1, -3 e -5 da população estudada, segundo os esquemas terapêuticos, a resposta ao tratamento e o genótipo viral, $p < 0.05$ .....	64
<b>Capítulo IV - Anexos</b> .....	<b>77</b>
Tabela 1: Seqüências dos <i>primers</i> utilizados para a amplificação dos sistemas HPA-1 a -5 ...	77
Tabela 2: Dados coletados durante a realização do projeto.....	78

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

CRP	<i>C-Reactive Protein</i>
DNA	<i>Desoxyribonucleic Acid</i>
ECM	<i>Extracellular Matrix</i>
FT	Falha Terapêutica
GP	Glicoproteína
HBV	<i>Hepatitis B Virus</i>
HCC	<i>Hepatocellular Carcinoma</i>
HCV	<i>Hepatitis C Virus</i>
HIV	<i>Human Immunodeficiency Virus</i>
HLA	<i>Human Leucocytes Antigens</i>
HPA	<i>Human Platelet Antigens</i>
HSC	<i>Hepatic Stellate Cell</i>
IFN	Interferon
IFN- $\alpha$	Interferon Alfa
IFN- $\beta$	Interferon Beta
IFN- $\gamma$	Interferon Gama
IFN-Peg	Interferon Alfa Peguilado
IgG	Imunoglobulina G
IL-10	<i>Interleukin-10</i>
IRES	<i>Internal Ribossomal Entry Site</i>
IRF-7	<i>Interferon Regulatory Factor 7</i>
ISG	<i>Interferon Stimulated Gene</i>
NANB	Hepatite Não-A-Não-B
NK	<i>Natural Killer Cell</i>
NS	Proteínas Não-estruturais
ORF	<i>Open Reading Frame</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PEG	<i>Polyethylene Glycol Polymer</i>
RBV	Ribavirina

RFLP	<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>
RGD	Arginina-Glicina-Aspartato
RIG-I	<i>Retinoid Acid-Inducible Gene-1</i>
RNA	<i>Ribonucleic Acid</i>
RSV	<i>Respiratory Syncytial Virus</i>
RT-PCR	<i>Reverse Transcription – Polymerase Chain Reaction</i>
RVS	Resposta Viroológica Sustentada
SNP	<i>Single Nucleotide Polymorphism</i>
SOCS3	<i>Suppressor of Cytokine Signaling 3</i>
SSP	<i>Sequence Specific Primers</i>
TGF- $\beta$	<i>Transforming Growth Factor-<math>\beta</math></i>
TGF- $\beta$ 1	<i>Transforming Growth Factor-<math>\beta</math>1</i>
TNF- $\alpha$	<i>Tumor Necrosis Factor-<math>\alpha</math></i>
UTR	<i>Untranslated Region</i>
VGDN	<i>Viral Genetic Diversity Network</i>
VHC	Vírus da Hepatite C
$\chi^2$	Chi-Quadrado

**SUMÁRIO**

<b>Capítulo I.....</b>	<b>14</b>
Introdução .....	14
<b>Capítulo II.....</b>	<b>38</b>
Artigo: Allelic frequencies of HPA-1 to 5 human platelet antigens in infected with hepatitis C virus .....	38
<b>Capítulo III.....</b>	<b>47</b>
Artigo: Human platelets antigens -1, -3, -4, -5 and liver fibrosis in HCV infected patients ....	47
<b>Capítulo IV .....</b>	<b>58</b>
Artigo: Association between HPA-1, -3, -4, -5 and treatment response in hepatitis C virus (HCV) infected patients .....	58
<b>Capítulo V – Outros trabalhos em colaboração .....</b>	<b>73</b>
Rede da Diversidade Genética Viral (VGDN).....	73
Análise comparativa das metodologias de hibridização reversa e seqüenciamento direto para a genotipagem do vírus da hepatite C .....	75
<b>Capítulo VI .....</b>	<b>77</b>
Anexo 1: Tabela com as seqüências dos <i>primers</i> utilizados para amplificação dos sistemas HPA-1 a -5.....	77
Anexo 2: Dados coletados durante o projeto .....	78

# *Capítulo I*

---

Introdução sobre o Vírus da Hepatite C e os Antígenos Plaquetários Humanos



## INTRODUÇÃO

A hepatite C é uma doença que vem sendo considerada a grande pandemia do início deste milênio<sup>1</sup>, sendo até mesmo conhecida por alguns estudiosos como “Doença do século XXI”<sup>2</sup>. Ela é consequência da infecção por um vírus hepatotrópico denominado *Hepatitis C Virus* (HCV) ou Vírus da Hepatite C (VHC)<sup>3</sup>. Atualmente este vírus infecta cerca de 170 milhões de pessoas em todo o mundo<sup>4-6</sup>.

O Vírus da Hepatite C foi identificado em 1989 por Choo e col.<sup>7</sup>, como agente etiológico da doença designada anteriormente por “Hepatite Não-A-Não-B (NANB)”, que representava 90% dos casos das hepatites pós-transfusionais. O nome Não-A-Não-B foi utilizado de 1975 até 1989, quando a partir da descoberta do HCV o termo Hepatite C se estabeleceu<sup>8</sup>.

O HCV é um vírus envelopado, da Família *Flaviviridae*, pertencente ao gênero *Hepacivirus*<sup>9,10</sup>, com 55 a 65 nm de diâmetro<sup>11,12</sup> (Figura 1). O genoma viral é constituído de uma molécula de RNA fita simples, com polaridade positiva e aproximadamente 9.400 nucleotídeos<sup>3,13-15</sup>. Com uma única região aberta de leitura (ORF), o RNA viral codifica uma poliproteína precursora de aproximadamente 3.011 aminoácidos, a qual é clivada por proteases celulares e virais, originando várias proteínas estruturais e não-estruturais. Nas extremidades do genoma estão localizadas as regiões não traduzidas 5' e 3' (*untranslated region* – UTR)<sup>3,10</sup> (Figura 2).

A região 5'UTR é altamente conservada, com aproximadamente 341 nucleotídeos<sup>16-18</sup> e desempenha um papel importante na replicação do vírus, pois apresenta uma região conhecida como IRES (*Internal Ribosomal Entry Site*), essencial na tradução do genoma viral<sup>17</sup> (Figura 2).

A região 3'UTR é formada por uma região variável de aproximadamente 40 nucleotídeos, seguida de uma seqüência de resíduos de uracila e uma

região conservada de 98 nucleotídeos, muito importante na replicação viral<sup>17</sup> (Figura 2).

As proteínas estruturais do HCV são representadas pela proteína C ou proteína do core, pelas glicoproteínas do envelope (E1 e E2)<sup>19,20</sup> e por um pequeno peptídeo conhecido como p7<sup>21</sup>. A proteína C é a segunda região mais conservada do genoma viral e constitui o seu nucleocapsídeo, sendo codificada pelo gene do core. Já as glicoproteínas do envelope E1 e E2 possuem regiões extremamente hipervariáveis, sendo responsáveis pela ligação do vírus a receptores do hospedeiro<sup>19,20</sup>. O peptídeo p7 possui 63 aminoácidos<sup>22</sup> e provavelmente está envolvido na replicação do HCV, com atividade de canal iônico, porém sua função ainda não é totalmente conhecida<sup>17</sup> (Figuras 2 e 3).

As proteínas não-estruturais (NS) estão envolvidas basicamente na replicação viral e são classificadas em: NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A e NS5B<sup>21</sup> (Figuras 2 e 3).

A proteína NS2 aparece associada com a NS3, formando a auto-protease NS2/NS3. Ela é a primeira a ser ativada, sendo responsável pela maturação das outras proteínas NS<sup>23</sup> e pela clivagem da junção NS2/NS3<sup>17</sup>.

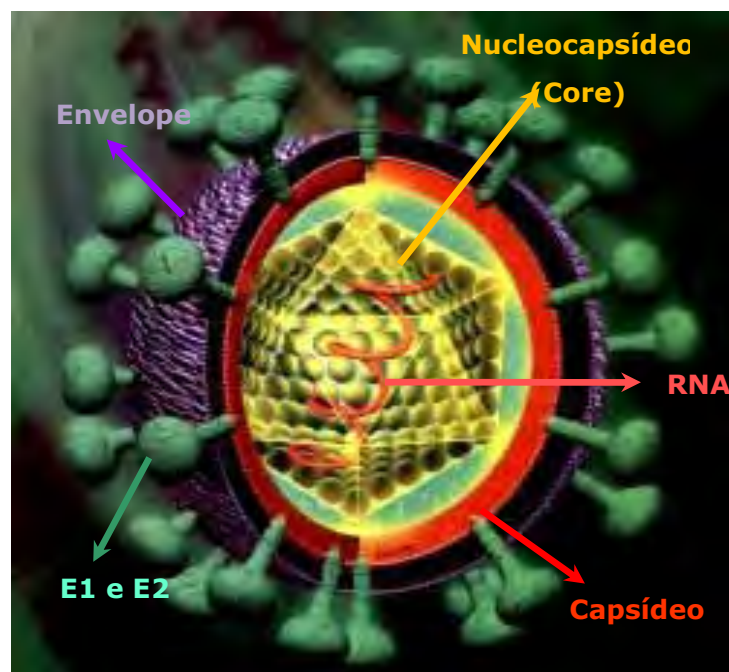
A NS3 é uma proteína multifuncional, responsável principalmente pelos eventos de clivagem que ocorrem na porção não-estrutural da poliproteína precursora<sup>24</sup>. Ela possui um domínio RNA helicase/ATPase que provavelmente está envolvido no início da síntese de RNA<sup>25</sup>.

O polipeptídeo NS4A funciona como um co-fator para a proteína NS3, formando o complexo NS3/NS4A. Sua porção central é incorporada como um componente integral do core, sendo necessária para o processamento da poliproteína precursora<sup>17,24</sup>. A região NS3/NS4A vem sendo considerada um alvo para a terapia antiviral, uma vez que sua inibição poderia estar relacionada com o bloqueio da replicação do HCV<sup>26</sup>.

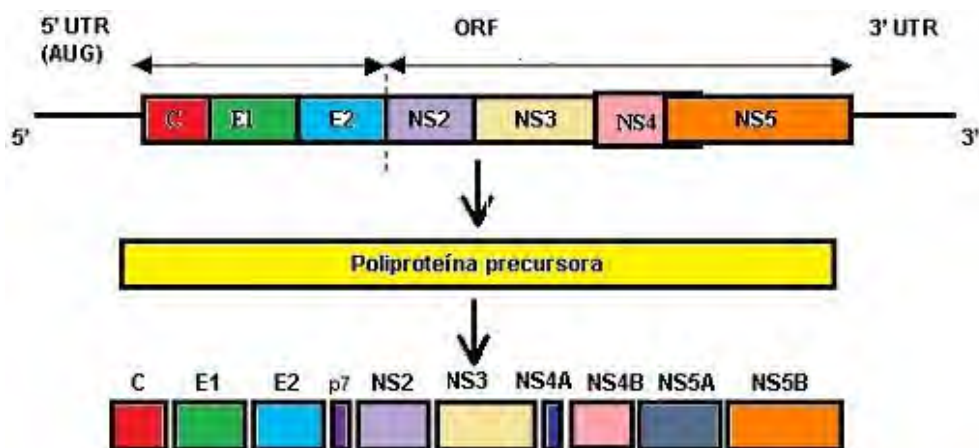
A NS4B ainda não possui uma função bem caracterizada. É sugerido que ela induz a formação de uma rede de membranas que auxiliam na replicação do HCV<sup>27</sup>.

Sem função completamente estabelecida, a NS5A possivelmente desempenha funções reguladoras no processo de replicação. Essa proteína vem sendo bastante estudada, pois possui um papel na modulação da resposta ao interferon<sup>24</sup>.

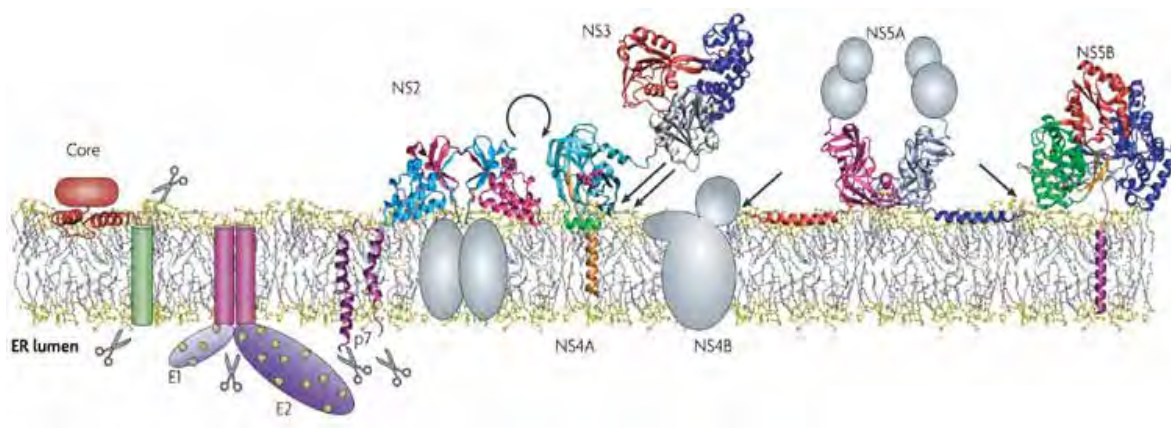
A proteína NS5B é essencial para a replicação do HCV, pois é responsável pela replicação do material genético do vírus que dará origem aos novos vírions. É considerada atualmente como o principal alvo para a terapia antiviral<sup>22</sup>.



**Figura 1:** Estrutura do Vírus da Hepatite C (Adaptado de [www.duke.edu/~sbrad](http://www.duke.edu/~sbrad)).

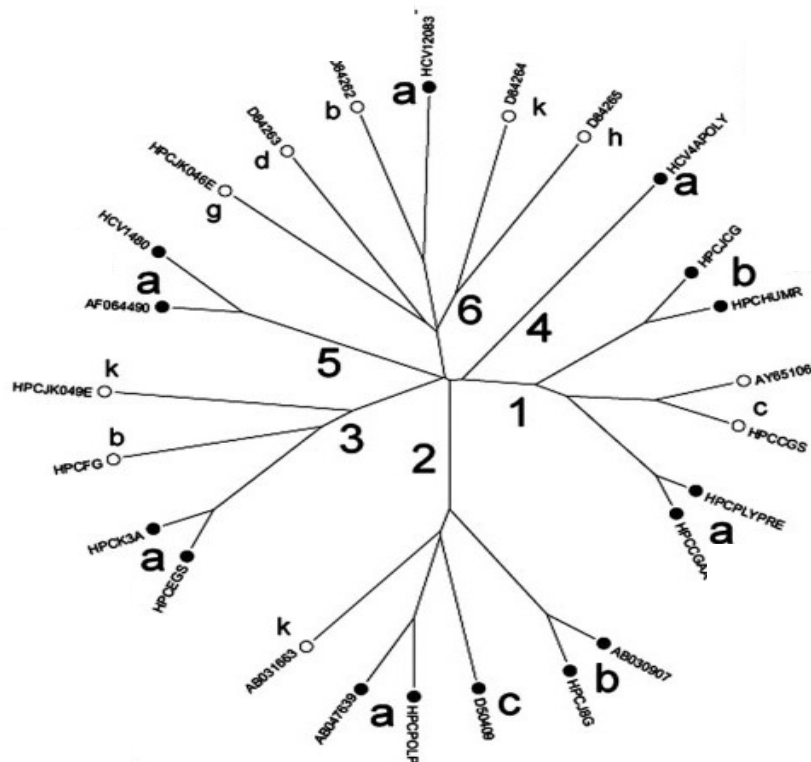


**Figura 2:** Genoma do HCV e processamento da poliproteína precursora (Adaptado de [www.seimc.org/control/revi\\_viro/variaVHC.htm](http://www.seimc.org/control/revi_viro/variaVHC.htm)).



**Figura 3:** Proteínas do HCV e locais de clivagem (Adaptado de Moradpour et al., 2007<sup>22</sup>).

Devido à alta variabilidade genética do HCV, vários tipos virais vêm sendo descritos, baseados na diversidade das seqüências de RNA do seu genoma. A classificação utilizada é a de seis genótipos designados pelos números de 1 a 6 e vários subtipos designados por letras do alfabeto<sup>18</sup>. Os genótipos diferem entre si em 31% a 33% dos nucleotídeos, enquanto que os subtipos diferem em aproximadamente 20% a 25% dos nucleotídeos<sup>19,28</sup> (Figura 4). No Brasil, os genótipos 1, 2 e 3 são os mais freqüentes, com predominância do genótipo 1 na maioria dos Estados<sup>3</sup>.



**Figura 4:** Árvore filogenética dos genótipos e subtipos do HCV (Adaptado de Simmonds et al., 2005<sup>18</sup>).

No contexto laboratorial, quando se considera as metodologias baseadas em ácidos nucléicos, a região 5'UTR por ser mais conservada vem sendo bastante utilizada em testes diagnósticos<sup>16,17</sup> e de genotipagem viral<sup>18</sup>. Além da região 5'UTR, a seqüência codificadora da proteína não estrutural NS5B também vem sendo utilizada para genotipagem do HCV. Esta região é menos conservada e está compreendida entre os nucleotídeos 7601 e 9374, sendo utilizada preferencialmente para subtipagem viral<sup>16</sup>.

A hepatite C freqüentemente é assintomática e uma grave conseqüência é sua progressão para a cirrose hepática<sup>29</sup>. A infecção apresenta uma progressão gradual da fibrose, até o desarranjo da arquitetura do fígado levando a alterações na função do hepatócito e na microcirculação. Em vista disso, uma forma de avaliar a gravidade desta doença é pelo estadiamento da fibrose hepática<sup>30</sup>. Sua fase aguda é freqüentemente subclínica e a evolução para a cronicidade ocorre em aproximadamente 85% dos casos<sup>31,32</sup>. A fase crônica caracteriza-se por cirrose hepática em cerca de 20% dos casos, com chance de desenvolvimento de hepatocarcinoma em 1 a 4% desses pacientes ao ano<sup>32-34</sup>. Entretanto, essa história natural ainda não é totalmente clara, uma vez que, o desenvolvimento para a cirrose hepática não está bem estabelecido em todas as populações estudadas. Freeman e col. (2001)<sup>35</sup> demonstraram que o risco para o desenvolvimento de cirrose é mais elevado em pacientes com história de hepatite pós-transfusional e naqueles atendidos em clínicas de hepatologias, do que em doadores de sangue.

Além disso, outros fatores como sexo, idade no momento da infecção (>40 anos), consumo de álcool, duração da infecção viral (>20 anos), co-infecção com HIV (*Human Immunodeficiency Virus*), co-infecção com HBV (*Hepatitis B Virus*), *diabetes mellitus*, obesidade, excesso de ferro no tecido hepático e raça estão associados com a progressão mais rápida da fibrose hepática<sup>29,35,36</sup>. Recentemente, outros trabalhos vêm associando essa

progressão a novos fatores como esteatose, resistência a insulina, estresse oxidativo e cascata de coagulação<sup>37</sup>.

A biópsia hepática é de suma importância e considerada padrão-ouro para avaliação do dano hepático. Ela classifica a atividade necro-inflamatória e o estadiamento da fibrose, sendo esta classificação utilizada como um dos critérios para indicação ou não da terapia antiviral. A histopatologia da hepatite C crônica apresenta as alterações clássicas das hepatites crônicas e também aspectos peculiares, como agregados linfóides proeminentes em espaços-porta, lesão de ductos biliares e esteatose leve à moderada<sup>36,38</sup>. Para o estadiamento da fibrose hepática a classificação mais utilizada atualmente é o escore do sistema METAVIR, onde F0 significa ausência de fibrose, F1 fibrose portal sem septos, F2 expansão fibrosa com poucos septos, F3 numerosos septos podendo visualizar esboços de nódulos e F4 cirrose<sup>30</sup>.

A associação dos diferentes genótipos com os aspectos clínicos, a evolução da doença ou a progressão para cirrose ainda é amplamente discutida. Estudos iniciais associavam o genótipo 1b como o mais propenso à evolução para cirrose e hepatocarcinoma, porém não foram confirmados, uma vez que não consideravam fatores importantes para a progressão, como a idade e a ingestão de álcool<sup>39,40</sup>. Por outro lado, a indicação do tratamento antiviral encontra-se na dependência do genótipo do HCV, com a finalidade de obter melhor resposta virológica sustentada (RVS). A taxa de resposta virológica sustentada nos pacientes infectados com o genótipo 1 é significativamente inferior à que se observa em pacientes infectados com os outros genótipos, principalmente 2 e 3<sup>36</sup>.

O objetivo da terapia antiviral para pacientes com hepatite C é atingir a resposta virológica sustentada, isso ocorre quando os níveis de RNA do HCV permanecem indetectáveis por um período mínimo de seis meses após o término do tratamento<sup>41</sup>. Os medicamentos atualmente utilizados são o

interferon alfa (IFN- $\alpha$ ), interferon alfa peguilado (IFN-Peg) e a ribavirina (RBV). Esses medicamentos, administrados de uma forma combinada, elevam a taxa de resposta virológica sustentada, com correspondente melhora na análise histológica e, possivelmente, nas complicações em longo prazo da hepatite. O IFN- $\alpha$  é administrado na forma de injeções por via subcutânea e a RBV em comprimidos por via oral, normalmente durante 24 semanas<sup>3,42</sup>. O IFN-Peg é outra opção de tratamento, que aumenta o índice de resposta terapêutica e apresenta vantagens em relação ao IFN- $\alpha$ . Uma delas é a melhoria de qualidade de vida do paciente, no que diz respeito à utilização do medicamento, uma vez que o mesmo é utilizado em dose única semanal, ao contrário do IFN- $\alpha$ , que deve ser injetado em três doses semanais. Isto implica numa diminuição dos efeitos colaterais que o medicamento possui. O tratamento consiste da associação do IFN-Peg com a RBV, administrados durante 48 semanas, e os maiores benefícios aparecem em pacientes com genótipo 1, pois estes quando tratados com IFN- $\alpha$ +RBV possuem um menor índice de RVS comparados com outros genótipos<sup>43,44</sup>. No Brasil, os pacientes infectados pelos genótipos 2 e 3, por possuírem uma boa resposta ao tratamento com IFN- $\alpha$ +RBV, devem continuar com a primeira opção de tratamento<sup>3,42</sup>. Apesar da combinação IFN-Peg+RBV ser considerada o tratamento padrão-ouro, ela é muito onerosa quando comparada com as taxas de RVS produzidas, que são de aproximadamente 50%<sup>45</sup>.

Desta forma, a genotipagem do HCV constitui um fator de suma importância na decisão da conduta terapêutica, podendo ser um forte preditor para a resposta virológica sustentada do tratamento<sup>34</sup>. Hoje existe mais de uma tecnologia para genotipagem viral disponível no mercado. O Programa Estadual de Hepatites Virais<sup>3</sup> disponibiliza aos laboratórios da Rede o kit *Line Probe Assay* (INNO-LiPA<sup>®</sup> v.1.0), distribuído pela Siemens, para genotipar os vírus presentes em pacientes que atendem os critérios de solicitação médica. A metodologia envolve a hibridização dos produtos



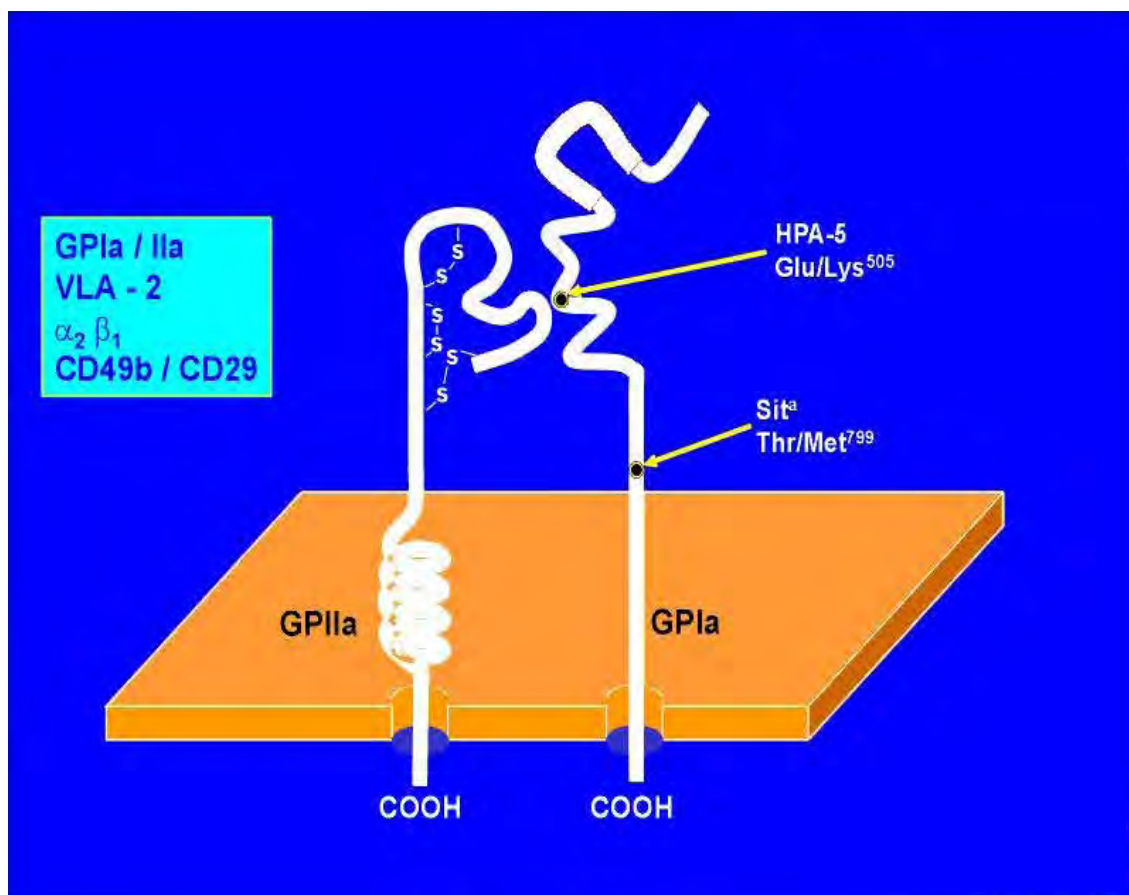
amplificados da região gênica 5'UTR com sondas específicas para os diferentes genótipos virais<sup>46</sup>. No entanto, as tecnologias *in house* que utilizam o seqüenciamento do DNA, podem evidenciar detalhes dos genótipos e subtipos que mostrem soluções para alguns casos indefinidos. Por ser mais sensível, quando comparado aos testes de hibridização<sup>47</sup>, o seqüenciamento automático é considerado padrão-ouro para genotipagem e subtipagem viral<sup>48</sup>.

Embora as células alvo do HCV sejam os hepatócitos, existem relatos da presença do vírus em outras células humanas. Estudos mostraram que os linfócitos T e B<sup>49</sup>, monócitos, macrófagos<sup>50,51</sup>, células dendríticas<sup>52,53</sup>, plaquetas<sup>54-56</sup> e outros tipos celulares podem "carregar" ou possuir alguma interação com HCV.

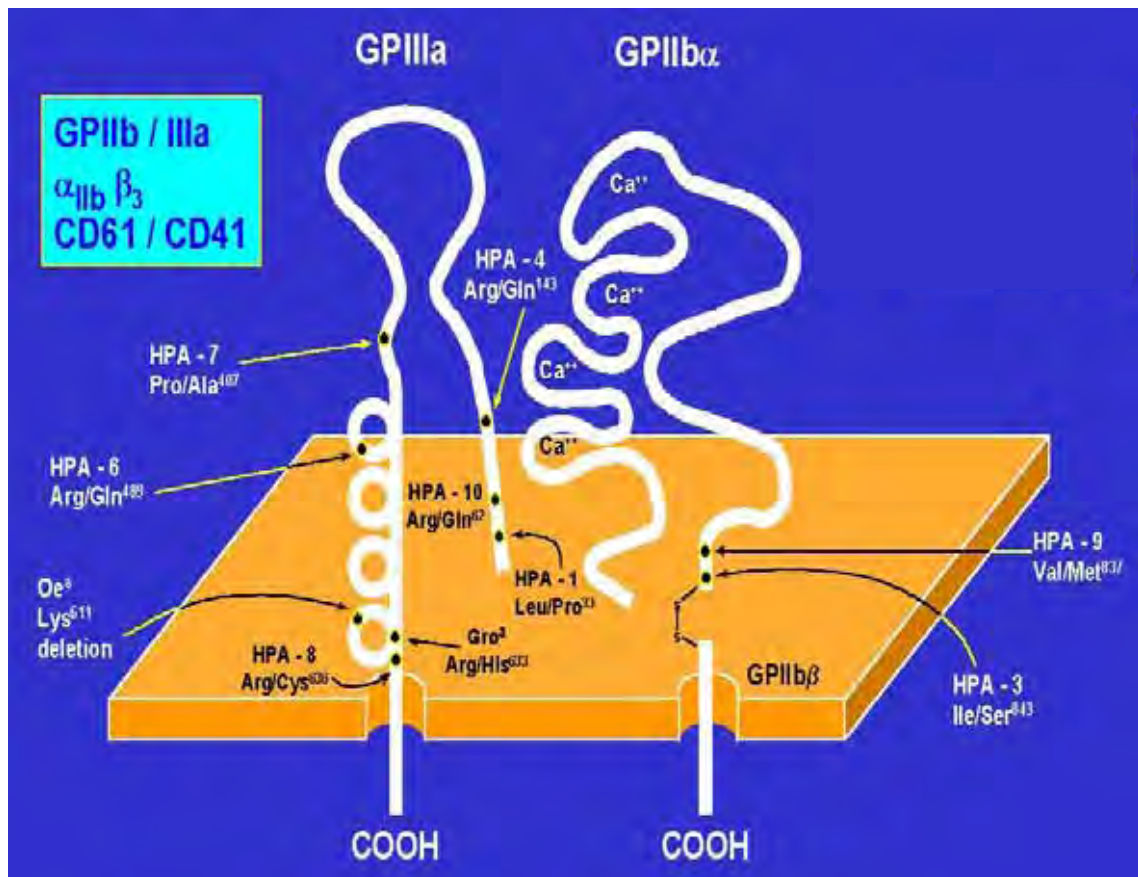
As plaquetas humanas expressam três grupos de antígenos: antígenos eritrocitários, antígenos HLA (*Human Leucocytes Antigens*) e antígenos específicos de plaquetas HPA (*Human Platelet Antigens*)<sup>57</sup>. Atualmente, estima-se que existam 24 tipos de antígenos HPA expressos nas plaquetas, sendo 12 deles agrupados em sistemas bialélicos (HPA-1 a -5 e -15), onde o alelo mais comum é chamado de "a" e o mais raro de "b". Os HPAs mais estudados pertencem a cinco sistemas, denominados Sistemas HPA -1, -2, -3, -4 e -5<sup>58</sup>. Esses antígenos são formados por segmentos protéicos polimórficos situados no interior de glicoproteínas (GP) da membrana plaquetária. O polimorfismo, na maioria destes antígenos, é devido à substituição de um único aminoácido na proteína, em consequência da substituição de um nucleotídeo no DNA<sup>59,60</sup>. Essas mutações de aminoácidos conduzem a alterações conformacionais na estrutura tridimensional das glicoproteínas, criando determinantes aloantigênicos reconhecidos pelas células B e T<sup>61</sup>. Essas glicoproteínas, presentes nas membranas das plaquetas, são as mediadoras do estágio inicial da função plaquetária, as quais também intervêm na agregação das mesmas, através da ligação do fibrinogênio e de outras proteínas de adesão<sup>62,63</sup>. Algumas destas proteínas,

além de funcionarem como receptores de função hemostática primária, são constituintes imunogênicos. Há mais de trinta tipos diferentes de glicoproteínas ligadas à membrana plaquetária, porém, as que determinam o maior número de implicações clínicas são os complexos GPIa/IIa ( $\alpha_2/\beta_1$  – CD49b/CD29), GPIIb/IIIa ( $\alpha_{IIb}/\beta_3$  – CD61/CD41) e GPIb/IX/V (CD42)<sup>63</sup>, que em sua maioria são da família das integrinas<sup>58</sup> (Figuras 5, 6 e 7).

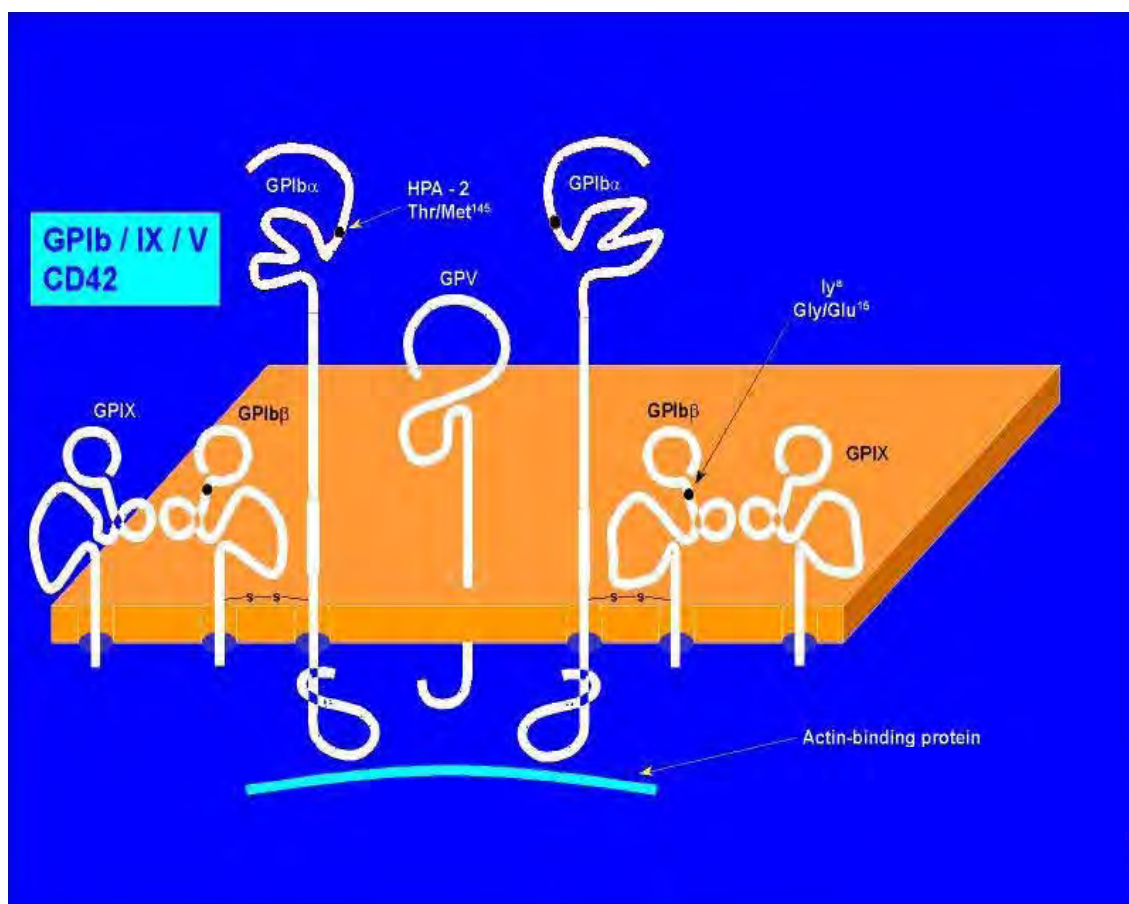
Integrinas são glicoproteínas transmembrana pertencentes a uma superfamília de heterodímeros que atuam como receptores para várias proteínas da matriz extracelular ou da superfície celular. Além de serem mediadoras da adesão celular, elas são importantes na iniciação de sinais bioquímicos que contribuem para uma variedade de respostas celulares, incluindo a sobrevivência, proliferação, migração e diferenciação celular<sup>64,65</sup>. Os sistemas HPA-1, -3, -4 (Complexo GPIIb/IIIa) e -5 (GPIa/IIa) estão localizados em glicoproteínas que pertencem à família das integrinas, enquanto que o sistema HPA-2 (GPIb/IX/V) em uma glicoproteína da família das glicoproteínas ricas em leucina<sup>58</sup>.



**Figura 5:** Complexo glicoprotéico GPIa/IIa presente nas membranas plaquetárias (Adaptado de Santoro & Zutter, 1995<sup>66</sup>).



**Figura 6:** Complexo glicoprotéico GPIIb/IIIa presente nas membranas plaquetárias (Adaptado de Bachelot et al., 1995<sup>67</sup>).



**Figura 7:** Complexo glicoprotéico GPIb/IX/V presente nas membranas plaquetárias (Adaptado de [www.nibsc.ac.uk/aboutus/platelets.asp?id=31](http://www.nibsc.ac.uk/aboutus/platelets.asp?id=31)).

Influências genéticas no curso da doença hepática pelo HCV têm sido amplamente estudadas<sup>68-72</sup>, particularmente com os antígenos leucocitários humanos (HLA)<sup>73-75</sup>. De maneira semelhante, os antígenos plaquetários humanos (HPA) estão associados a certas doenças como: púrpura pós-transfusional<sup>76,77</sup>, trombocitopenia aloimune neonatal<sup>78</sup>, infarto do miocárdio<sup>79</sup>, trombose<sup>80</sup>, entre outras. Estudos têm sugerido que a infecção pelo HCV induz uma significativa reação auto-imune envolvendo as plaquetas. Pacientes com hepatite C crônica apresentam trombocitopenia e altos níveis de imunoglobulina G (IgG) anti-plaquetas. Além disso, estudos vêm demonstrando que o RNA do HCV pode estar presente nas plaquetas<sup>54-56,81,82</sup>.

Os mecanismos de entrada do HCV nas plaquetas ainda não estão perfeitamente elucidados. Um estudo de Hamaia e col. (2001)<sup>55</sup> demonstrou que o CD81, receptor de superfície celular necessário à entrada do HCV em outros tipos de células, não está expresso nas plaquetas, não sendo, portanto, o responsável pela entrada do vírus nas mesmas. O CD81 é integrante de uma superfamília de proteínas conhecidas como Tetraspaninas (TM4SF), cujos membros normalmente formam complexos moleculares com as glicoproteínas da família das integrinas<sup>83</sup>. Além disso, as integrinas normalmente são utilizadas como receptores por vírus para entrada nas células do hospedeiro<sup>84,85</sup>.

Fazendo um paralelo poderíamos levantar a hipótese que alguns antígenos HPA, localizados em proteínas pertencentes à família das integrinas, podem estar envolvidos no processo de ligação do HCV às plaquetas. Dessa forma, uma mudança na estrutura tridimensional dessas glicoproteínas plaquetárias, provocada por uma mutação, poderia facilitar ou dificultar a "entrada" do vírus nas plaquetas. Estudos são necessários para avaliar se existe alguma associação entre antígenos HPA e o HCV, bem como se esses antígenos podem estar envolvidos na progressão da doença ou na resposta ao tratamento.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Passos ADC. Doenças emergentes e Hepatite C. *Cad Saúde Pub.* 1999;15(2):226-7.
2. Bezerra, CS. Estudo molecular do vírus da hepatite C isolado de pacientes atendidos em hospital de referência em Fortaleza, Ceará. Fortaleza [Dissertação de mestrado]. Ceará: Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, 2006.
3. Brasil. Ministério da Saúde. Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas - Hepatite Viral Crônica C. Interferon-alfa, Interferon-alfa Peguilado, Ribavirina. Programa Nacional de Hepatites Virais. Série C - Projetos, Programas e Relatórios. Brasília: 2002.
4. Lauer GM, Walker BD. Hepatitis C virus infection. *N Eng J Med.* 2001;345:41-52.
5. NIH - National Institutes of Health Consensus Development Conference Statement: Management of Hepatitis C. *Gastroenterology.* 2002;6:2082-99.
6. WHO - World Health Organization. *Weekly Epidemiological Record.* 2002;77: 41-8.
7. Choo QL, Kuo G, Weiner AJ, Overby LR, Bradley DW, Houghton M. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science.* 1989;244(4902):359-62.
8. Alter HJ, Houghton M. Clinical Medical Research Award. Hepatitis C virus and eliminating post-transfusion hepatitis. *Nat Med.* 2000;6(10):1082-6.

9. Shukla DD, Hoyne PA, Ward CW. Evaluation of complete genome sequences and sequences of individual gene products for the classification of hepatitis C viruses. *Arch Virol.* 1995;140:1747-61.
10. Moradpour D, Cerny A, Heim MH, Blum HE. Hepatitis C: an update. *Swiss Med Wkly.* 2001;131:291-8.
11. Kaito M, Watanabe S, Tsukiyama-Kohara K, Yamaguchi K, Kobayashi Y, Konishi M, et al. Hepatitis C virus particle detected by immunoelectron microscopic study. *J Gen Virol.* 1994;75:1755-60.
12. Shimizu YK, Feinstone SM, Kohara M, Purcell RH, Yoshikura H. Hepatitis C virus: detection of intracellular virus particles by electron microscopy. *Hepatology.* 1996;23:205-9.
13. Choo QL, Richman KH, Han JH, Berger K, Lee C, Dong C, et al. Genetic organization and diversity of the hepatitis C virus. *Procs Natl Acad Sci USA.* 1991;88:2451-5.
14. Simmonds P. Viral heterogeneity of the hepatitis C virus. *J Hepatol.* 1999;3 Suppl 1:54-60.
15. Bartenschlager R, Lohmann V. Replication of hepatitis C virus. *J Gen Virol.* 2000;81:1631-48.
16. Corbet S, Bukh J, Heinsen A, Fomsgaard A. Hepatitis C Virus subtyping by a core-envelope 1-based reverse transcriptase PCR assay with sequencing and its use in determining subtype distribution among Danish patients. *J Clin Microbiol.* 2003;41(3):1091-100.
17. Lindenbach BD, Rice CM. Unraveling hepatitis C virus replication from genome to function. *Nature.* 2005;436(7053):933-8.



18. Simmonds P, Bukh J, Combet C, Deléage G, Enomoto N, Feinstone S, et al. Consensus proposals for a unified system of nomenclature of Hepatitis C Virus genotypes. *Hepatology*. 2005;42:962-73.
19. Simmonds P, Holmes EC, Cha TA, Chan SW, McOmish F, Irvine B, et al. Classification of hepatitis C virus into six major genotypes and a series of subtypes by phylogenetic analysis of the NS-5 region. *J Gen Virol*. 1993;74:2391-9.
20. Zein NN. Clinical significance of hepatitis C virus genotypes. *Clin Microbiol Rev*. 2000;13(2):223-35.
21. Germer JJ, Zein NN. Advances in the molecular diagnosis of hepatitis C and their clinical implications. *Mayo Clin Proc*. 2001;76:911-20.
22. Moradpour D, Penin F, Rice CM. Replication of hepatitis C virus. *Nat Rev Microbiol*. 2007;5(6):453-63.
23. Dumoulin FL, vom dem Bussche A, Li J, Khamzina L, Wands JR, Sauerbruch T, et al. Hepatitis C virus NS2 protein inhibits gene expression from different cellular and viral promoters in hepatic and nonhepatic cell lines. *Virology*. 2003;305:260-6.
24. Roingeard P, Hourieux C, Blanchard E, Brand D, Ait-Goughoulte M. Hepatitis C virus ultrastructure and morphogenesis. *Biol Cell*. 2004;96(2):103-8.
25. Serebrov V, Pyle AM. Periodic cycles of RNA unwinding and pausing by hepatitis C virus NS3 helicase. *Nature*. 2004;430:476-80.
26. Franco S, Clotet B, Martínez MA. A wide range of NS3/4A protease catalytic efficiencies in HCV-infected individuals. *Virus Res*. 2008;131:260-70.

27. Egger D, Wölk B, Gosert R, Bianchi L, Blum HE, Moradpour D, et al. Expression of hepatitis C virus proteins induces distinct membrane alterations including a candidate viral replication complex. *J Virol.* 2002;76:5974-84.
28. Robertson B, Myers G, Howards C, Brettin T, Bukh J, Gaschen B, 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.* 1998;143:2493-503.
29. Seeff LB. Natural history of chronic hepatitis C. *Hepatology.* 2002;36:S35-46.
30. Poynard T, Bedossa P, Opolon P, for the OBSVIRC, METAVIR, CLINIVIR, and DOSVIRC groups. Natural history of liver fibrosis progression in patients with chronic hepatitis C. *Lancet.* 1997;349(9055):825-32.
31. Alter HJ, Seeff LB. Recovery, persistence, and sequelae in hepatitis C virus infection: a perspective on long-term outcome. *Semin Liver Dis.* 2000;20(1):17-35.
32. Seeff LB, Hoofnagle JH. National Institutes of Health Consensus Development Conference: management of hepatitis C: 2002. *Hepatology.* 2002;36:S1-2.
33. Di Bisceglie AM. Hepatitis C and hepatocellular carcinoma. *Hepatology.* 1997;26 Suppl 1:S34-8.
34. EASL - International consensus conference on hepatitis C. Consensus Statement. *J Hepatol.* 1999;30:956-61.

35. Freeman AJ, Dore GJ, Law MG, Thorpe M, Von Overbeck J, Lloyd AR, et al. Estimating progression to cirrhosis in chronic hepatitis C virus infection. *Hepatology*. 2001;34(4):809-16.
36. Poynard T, Ratziu V, Benmanov Y, Dimartino V, Bedossa P, Opolon P. Fibrosis in the patients with chronic hepatitis C: detection and significance. *Semin Liver Dis*. 2000;20(1):47-55.
37. Feld JJ, Liang TJ. Hepatitis C – Identifying patients with progressive liver injury. *Hepatology*. 2006;43(2 Suppl 1):S194-206.
38. Poynard T, Yuen MF, Ratziu V, Lai CL. Viral hepatitis C. *Lancet*. 2003;362:2095-100.
39. Benvegna L, Pontisso P, Cavalletto D, Noventa F, Chemello L, Alberti A. Lack of correlation between hepatitis C virus genotypes and clinical course of hepatitis C virus related cirrhosis. *Hepatology*. 1997;25:211-5.
40. Martinot-Peignoux M, Roudot-Thoraval F, Mendel I, Coste J, Izopet J, Duverlie G, et al. Hepatitis C virus genotypes in France: relationship with epidemiology, pathogenicity and response to interferon therapy. The GEMHEP. *J Viral Hepat*. 1999;6(6):435-43.
41. Dhumeaux D, Marcellin P, Lerebours E. Treatment of hepatitis C. The 2002 French consensus. *Gut*. 2003;52:1784-7.
42. SBH – Sociedade Brasileira de Hepatologia. Consenso sobre condutas nas Hepatites Virais B e C - Hepatite C. São Paulo: Hotel Pestana, 2005.
43. Fried MW, Shiffman ML, Reddy KR, Smith C, Marinos G, Gonçalves FL Jr, et al. Peginterferon alfa-2a plus ribavirin for chronic hepatitis C virus infection. *N Engl J Med*. 2002;347(13):975-82.

44. Hadziyannis SJ, Sette H Jr, Morgan TR, Balan V, Diago M, PEGASYS International Study Group, et al. Peginterferon- $\alpha$ 2a and ribavirin combination therapy in chronic hepatitis C: a randomized study of treatment duration and ribavirin dose. *Ann Intern Med.* 2004;140:346–55.
45. Selzner N, Chen L, Borozan I, Edwards A, Heathcote EJ, McGilvray I. Hepatic gene expression and prediction of therapy response in chronic hepatitis C patients. *J Hepatol.* 2008;48:708-13.
46. Comanor L, Elkin C, Leung K, Kradjen M, Kronquist K, Nicolas K, et al. Successful HCV genotyping of previously failed and low viral specimens using an HCV RNA qualitative assay based on transcription-mediated amplification in conjunction with the line probe assay. *J Clin Virol.* 2003; 28(1),14-26.
47. Haushofer AC, Berg J, Hauer R, Trubert-Exinger D, Stekel HG, Kessler HH. Genotyping of hepatitis C virus – Comparison of three assays. *J Clin Virol.* 2003; 27(3):276-85.
48. Lau JY, Mizokami M, Kolberg JA, Davis GL, Prescott LE, Ohno T, et al. Application of six hepatitis C virus genotyping systems to sera from chronic hepatitis C patients in the United States. *J Infect Dis.* 1995;171:281-9.
49. Pavio N, Lai MMC. The hepatitis C virus persistence: how to evade the immune system? *J Biosci.* 2003;28(3):287-304.
50. Muller HM, Pfaff E, Goeser T, Kallinowski B, Solbach C, Thielman L. Peripheral blood leukocytes serve as a possible extrahepatic site for hepatitis C virus replication. *J Gen Virol.* 1993;74:669.
51. Booth JCL, Waters J, Thomas HC. Hepatitis C virus is present in CD8+ve T lymphocytes, B lymphocytes and monocytes but not in

- CD4+ve T lymphocytes in persistently infected patients. *Hepatology*. 1996;24(4):377A.
52. Navas MC, Fuchs A, Schvoerer E, Bohbot A, Aubertin AM, Stoll Keller F. Dendritic cell susceptibility to hepatitis C virus genotype 1 infection. *J Med Virol*. 2002;67:152-61.
  53. Goutagny N, Fatmi A, De Ledinghen V, Penin F, Couzigou P, Ichauspe G. Evidence of viral replication in circulating dendritic cells during hepatitis C virus infection. *J Infect Dis*. 2003;187:1951-8.
  54. Hernandez F, Blanquer A, Linares M, Lopez A, Tarin F, Cervero A. Autoimmune thrombocytopenia associated with hepatitis C virus infection. *Acta Haematol*. 1998;99(4):217-20.
  55. Hamaia S, Li C, Allain JP. The dynamics of hepatitis C virus binding to platelets and 2 mononuclear cell lines. *Blood*. 2001;98(8):2293-300.
  56. Pugliese A, Gennero L, Cutufia M, Enrietto M, Morra E, Pescarmona P, et al. HCV infective virions can be carried by human platelets. *Cell Biochem Funct*. 2004;22:353-8.
  57. Schroeder ML, Rayner HL. Red cell, platelet, and white cell antigens. In: Lee GR, et al. *Wintrobe's clinical hematology*. 9<sup>a</sup> ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1993.
  58. Metcalfe P. Platelet antigens and antibody detection. *Vox Sang*. 2004;87 Suppl 1:S82-6.
  59. Lucas GF, Metcalfe P. Platelet and granulocyte polymorphisms. *Transfus Med*. 2000;10:157-74.
  60. Metcalfe P, Watkins NA, Ouwehand WH, Kaplan C, Newman P, Kekomaki R, et al. Nomenclature of human platelet antigens. *Vox Sang*. 2003;85:240-5.

61. Santoso S, Kiefel V. Human platelet-specific alloantigens: update. *Vox Sang.* 1998;74 Suppl 2:249-53.
62. Kunicki TJ, Newman PJ. The molecular immunology of human platelet proteins. *Blood.* 1992;80:1386-404.
63. Santoso S. Clinical impact of platelet glycoprotein polymorphism. *Vox Sang.* 2000;78 Suppl 2:121-4.
64. Clark EA, Brugge JS. Integrins and signal transduction pathways: The road taken. *Science.* 1995;268:233-9.
65. Haubner R, Finsinger D, Kessler H. Stereoisomeric peptide libraries and peptidomimetics for designing selective inhibitors of the  $\alpha v\beta 3$  integrin for a new cancer therapy. *Chem Int Ed Eng.* 1997;36:1374-89.
66. Santoro SA, Zutter MM. The alpha2 beta1 integrin: a collagen receptor on platelets and other cells. *Thromb Haemost.* 1995;74(3):813-21.
67. Bachelot C, Rendu F, Gulino D. Anti-GPIIb/IIIa antibodies: powerful tools to investigate function and regulation of an integrins. *Semin Thromb Hemost.* 1995;21:23-36.
68. Powell EE, Edwards-Smith CJ, Hay JL, Clouston AD, Crawford DH, Shorthouse C, et al. Host genetic factors influence disease progression in chronic hepatitis C. *Hepatology.* 2000;31:828-33.
69. Thorburn D, Curry G, Spooner R, Spence E, Oien K, Halls D, et al. The role of iron and haemochromatosis gene mutations in the progression of liver disease in chronic hepatitis C. *Gut.* 2002;50:248-52.

70. Wright M, Goldin R, Hellier S, Knapp S, Frodsham A, Hennig B, et al. Factor V Leiden polymorphism and the rate of fibrosis development in chronic hepatitis C virus infection. *Gut*. 2003;52:1206-10.
71. Romero-Gómez M, Montes-Cano MA, Otero-Fernández MA, Torres B, Sánchez-Muñoz D, Aguilar F, et al. SLC11A1 promoter gene polymorphisms and fibrosis progression in chronic hepatitis C. *Gut*. 2004;53(3):446-50.
72. Yee LJ. Host genetic determinants in hepatitis C virus infection. *Genes Immun*. 2004;5:237-45.
73. Vejbaesya S, Songsivilai S, Tanwandee T, Rachaibun S, Chantangpol R, Dharakul T. HLA association with hepatitis C virus infection. *Hum Immunol*. 2000;61:348-53.
74. Patel K, Norris S, Lebeck L, Feng A, Clare M, Pianko S, et al. HLA Class I allelic diversity and progression of fibrosis in patients with chronic Hepatitis C. *Hepatology*. 2006;43:241-9.
75. Corghi DB, Gonçalves NSL, Marques SBD, Gonçalves Jr FL. Distribution of the human leukocyte antigen class II alleles in Brazilian patients with chronic hepatitis C virus infection. *Braz J Med Biol Res*. 2008;41(10):884-9.
76. Mueller-Eckhardt C, Kiefel V, Santoso S. 1990. Review and update of platelet alloantigen systems. *Transfus Med*. 1990;4:98-109.
77. Kroll H, Kiefel V, Santoso S. Clinical aspects and typing of platelet alloantigens. *Vox Sang*. 1998;74 Suppl 2:345-54.
78. Ohto H. Neonatal alloimmune thrombocytopenia. *Nippon Rinsho*. 1997;55(9):2310-4.

79. Ardissino D, Mannucci PM, Merlini PA, Duca F, Fetiveau R, Tagliabue L, et al. Prothrombotic genetic risk factors in young survivors of myocardial infarction. *Blood*. 1999;94(1):46-51.
80. Gorgi Y, Sfar I, Ben AAbdallah T, Aouadi H, Abderrahim E, Bardi R, et al. Human platelet antigens polymorphisms and susceptibility of thrombosis in hemodialysis patients. *Hemodial Int*. 2008;12:331-5.
81. Jimenez-Saenz M, Carmona Soria I, Caunedo Alvarez A, Gonzalez Vilchez J. Absence of antiviral activity of high-dose subcutaneous beta-interferon in patients with chronic infection by genotype 1 virus C hepatitis. *Med Clin (Barc)*. 2000;114(18):717.
82. Almeida AJ, Campos-de-Magalhães M, Melo Marçal OP, Brandão-Mello CE, Okawa MY, Oliveira RV, et al. Hepatitis C virus-associated thrombocytopenia: a controlled prospective, virological study. *Ann Hematol*. 2004;83(7):434-40.
83. Berditchevski F. Complexes of tetraspanins with integrins: more than meets the eye. *J Cell Sci*. 2001;114:4143-51.
84. Bergelson JM, Shepley MP, Chan BM, Hemler ME, Finberg RW. Identification of the integrin VLA-2 as a receptor for Echovirus 1. *Science* 1992;255:1718-20.
85. Isberg RR, Van Niheu GT. Binding and internalization of microorganisms by integrin receptors. *Trends Microbiol*. 1994;2:10-4.



# *Capítulo II*

---

Artigo publicado na revista "Journal of Medical Virology"

**Allelic frequencies of HPA-1 to 5 human platelet antigens in infected with hepatitis C virus.**

Camila Fernanda Verdichio-Moraes,<sup>1</sup> Cecília Toralles-Pereira,<sup>1</sup> Rejane Maria Tommasini Grotto,<sup>1</sup> Giovanni Faria Silva<sup>2</sup> and Maria Inês de Moura Campos Pardini<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Molecular Biology Laboratory of Blood Transfusion Center, Botucatu Medical School, São Paulo State University – UNESP, Botucatu-SP, Brazil.

<sup>2</sup>Department Internal Medicine of Gastroenterology Division, Botucatu Medical School, São Paulo State University – UNESP, Botucatu-SP, Brazil.

\*Correspondence to: Dra. Maria Inês Moura de Campos Pardini, Faculdade de Medicina - UNESP, Hemocentro, Distrito de Rubião Jr S/N, Botucatu-SP, CEP18618-000, Brasil. Tel and Fax:+55 014 3811 6041.

E-mail: inespardini@gmail.com

**Abstract:** Studies have suggested that hepatitis C virus (HCV) may infect not only hepatocytes but may also be carried by platelets. Platelets express more than 20 polymorphic antigenic determinants on their surface, which are called human platelet antigens (HPA). To determine the allele frequency of the HPA-1 to HPA-5 in patients infected with HCV, blood samples were collected from 257 blood donors for the control group and from 191 patients infected with HCV. DNA was isolated and amplified for genes HPA-1 to -4 using PCR Sequence Specific Primers (PCR-SSP) and HPA-5 using PCR Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP). The allelic and genotypic frequency of HPA-5a in patients infected with HCV was found to be significantly lower ( $p < 0.05$ ) than in the controls, and HPA-5b from patients infected with HCV was significantly higher ( $p < 0.05$ ) than in controls. The increase in HPA-5b allelic frequency in HCV infection may indicate a possible association between HCV infection and human platelet antigens.

**KEY WORDS:** Allelic frequencies; Hepatitis C virus; Human platelet antigens; Platelets.

## **Introduction**

Hepatitis C virus (HCV) infects approximately 170 million people around the world. HCV infection is resolved spontaneously in approximately 15-20% of cases, with chronic infection becoming established in the remaining 80-85% (Lauer & Walker, 2001). HCV is a major cause of chronic hepatitis, and many patients infected chronically may progress to liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma (Barth et al., 2003).

The predominant site of HCV replication and infection is the liver. However, several studies have suggested that HCV may infect not only hepatocytes but also B and T cells (Pavio & Lai, 2003), monocytes/macrophages (Muller et al., 1995) and dendritic cells (Goutagny et al., 2003), and the virus can interact with platelets (Pugliese et al., 2004).

Platelet membrane glycoproteins express several polymorphic antigenic determinants on their surface, which are called human platelet antigens (Bussel & Kaplan, 1998). To date, 24 platelet-specific alloantigens have been defined using specific immune sera, 12 of which are grouped into six biallelic systems (HPA-1 to -5, and -15) (Metcalf, 2004). These antigens are formed by polymorphic protein segments found in platelet membrane glycoprotein. The polymorphism in most of these antigens is due to the substitution of a single amino acid in the protein, caused by a single nucleotide substitution in the gene which encodes the relevant membrane glycoprotein. These amino acid mutations lead to conformational alterations in the three-dimensional structure of the glycoprotein (Metcalf et al., 2003). In particular, the HPA-1, -2, -3, -4 and -5 systems have been well established by serological tests and molecular analysis (Kunicki & Newman, 1992).

Genetic influences during the course of hepatitis C infection have been investigated, particularly with human leukocyte antigens (HLA) (Minton et al., 1998). Similarly, some human platelet antigens are also associated with diseases such as post-transfusion purpura, neonatal alloimmune thrombocytopenia (Muller-Eckhardt et al., 1990), myocardial infarction (Rosenberg et al., 2002), stroke (Reiner et al., 2000) and venous thrombosis (Ridker et al., 1997).

Recent findings have suggested that HCV infection induces a significant autoimmune reaction involving platelets. Studies have demonstrated that patients have HCV-RNA within platelets. The mechanisms by which HCV enters these platelets remain unknown (Hamaia et al., 2001).

In this context, the association between human platelet antigens and HCV carriers can determine the existence of an human platelet antigens profile associated more frequently with

HCV infection. The aim of this study was to determine the frequency of the HPA-1 to HPA-5 in patients infected with HCV.

### **Patients and methods**

Aliquots of EDTA-anticoagulated peripheral venous blood were collected from 257 blood donors at the Botucatu Medical School's Blood Transfusion Center for the control group, and 191 hepatitis C patients from the Department of Internal Medicine – Gastroenterology Division, Botucatu Medical School, São Paulo State University - UNESP, Botucatu, SP, Brazil. Inclusion criteria were: the presence of RNA-HCV confirmed by molecular assays and signed informed consent. Exclusion criteria were: patients with HBV or HIV positive serology, antiviral treatment before liver biopsy, and the presence of other hepatic diseases.

Genomic DNA was isolated from whole blood using a commercial Brazilian kit (LGC Biotecnologia, Brazil).

HPA-1 to -3 was genotyped by PCR Sequence Specific Primers according to Klüter et al. (1996), and HPA -4 by PCR-SSP according to Cavanagh et al. (1997). C-reactive protein gene (CRP) was used as an internal positive control in all reactions using the primers described by Klüter et al. (1996). The HPA-5 system was genotyped by PCR Restriction Fragment Length Polymorphism according to Kalb et al. (1994). A negative control was carried out in all PCR runs.

The Hardy-Weinberg equilibrium test was carried out to evaluate the distribution of gene frequencies of HPA-1 to -5. The chi-square test, used to investigate possible associations between genotypes and human platelet antigens alleles and patients, was performed by the GraphPad InStat Program<sup>®</sup>. The significance level for all statistical tests was set at 0.05.

### **Results**

Table I summarizes the HPA-1 to -5 allele and genotype frequencies in the patients and control groups.

There were no significant differences ( $p>0.05$ ) in the allele and genotype frequency distribution for the HPA-1, -2, -3 and -4 systems between the patients and the control groups. On the other hand, there was deviation from Hardy-Weinberg equilibrium in the HPA-5 system. The allele and genotype frequency of HPA-5a in the patients was found to be

significantly lower ( $p < 0.05$ ) than in the controls, and HPA-5b in the patients was significantly higher ( $p < 0.05$ ) than in the controls.

**Table I** Allelic and genotypes frequencies for HPA-1 to -5 in infected with HCV (n=191) compared with control group (n=257),  $p < 0.05$ .

	Infected with HCV (%)	Control group (%)	$\chi^2$	p Value
<b>Alleles</b>				
1a	337 (88.2)	436 (84.8)	2.13	0.14
1b	45 (11.8)	78 (15.2)		
2a	349 (91.4)	452 (87.9)	2.71	0.09
2b	33 (8.6)	62 (12.1)		
3a	268 (70.2)	340 (66.1)	1.61	0.20
3b	114 (29.8)	174 (33.9)		
4a	382 (100)	514 (100)		
4b	0	0		
5a	329 (86.1)*	467 (90.9)*	4.95	0.02
5b	53 (13.9)*	47 (9.1)*		
<b>Genotypes</b>				
1a/1a	154 (80.6)	188 (73.2)	4.61	0.09
1a/1b	29 (15.2)	60 (23.3)		
1b/1b	8 (4.2)	9 (3.5)		
2a/2a	163 (85.3)	202 (78.6)	3.65	0.16
2a/2b	23 (12.0)	48 (18.7)		
2b/2b	5 (2.7)	7 (2.7)		
3a/3a	103 (53.9)	119 (46.3)	2.86	0.24
3a/3b	62 (32.5)	102 (39.7)		
3b/3b	26 (13.6)	36 (14.0)		
4a/4a	191 (100)	257 (100)		
4a/4b	0	0		
4b/4b	0	0		
5a/5a	139 (72.8)*	212 (82.5)*	6.61	0.03
5a/5b	51 (26.7)*	43 (16.7)*		
5b/5b	1 (0.5)	2 (0.8)		

(\*Significant difference between infected with HCV and control group)

## Discussion

The course of HCV infection and the response to therapy can be related to viral and host factors (Asti et al., 1999). Among the host factors, HLA appears to play an important role in the association with HCV infection, mainly HLA class II antigens (Minton et al., 1998), which are crucial for antigen presentation of the T helper lymphocytes (Hüe et al., 2002). Some of the HLA alleles are associated with HCV infection (Jurado et al., 1997), with the development of chronicity (Thursz et al., 1999) or response to therapy (Almarri et al., 1998). On the other hand, other alleles can have a protective effect against HCV infection (Jurado et al., 1997).

Similarly, human platelet antigens are also associated with diseases. Studies have emphasized on adhesive receptors expressed on the platelet surface (Clemetson, 2003). Human platelet antigens plays an important role in several diseases such as neonatal alloimmune thrombocytopenic purpura and post-transfusion purpura. Several human platelet antigens systems have been reported; however, HPA-1, -2, -3, -4 and -5 have been well established (Kunicki & Newman, 1992), and different alleles are associated with different diseases.

The search for an association between human platelet antigens and diseases has been restricted mostly to genetic alterations that could alter the surface expression or activity of these proteins and lead to modification of the haemostatic process (Clemetson, 2003).

The study of human platelet antigens polymorphisms should not be restricted to thrombotic disorders (Iniesta et al., 2004), because the integrins are not expressed exclusively in platelets, but have been identified in other cells such as tumor cells or epithelial cells. Polymorphisms affecting these molecules could play a role in other situations or diseases, as suggested in allogeneic-hematopoietic stem cell transplantation (García-Malo et al., 2004) or cancer (Ayala et al., 2003).

Studies have demonstrated alterations in the frequency distributions of some human platelet antigens alleles between patients and control groups and their association with diseases. Similarly, in this study the significantly higher allele frequency of HPA-5b in HCV carriers suggests an association between this allele and HCV infection.

## References

- Almarri A, El-Dwick N, Al-Kabi S, Sleem K, Rashed A, Ritter MA, Batchelor JR. 1998. Interferon alpha therapy in HCV hepatitis: HLA phenotype and cirrhosis are independent predictors of clinical outcome. *Hum Immunol* 59(4):239-242.
- Asti M, Martinetti M, Zavaglia C, Cuccia MC, Gusberti L, Tinelli C, Cividini A, Bruno S, Salvaneschi L, Ideo G, Mondelli MU, Silini EM. 1999. Human leukocyte antigen class II and III alleles and severity of hepatitis C virus related chronic liver disease. *Hepatology* 29(4):1272-1279.
- Ayala F, Corral J, González-Conejero R, Sánchez I, Moraleda JM, Vicente V. 2003. Genetic polymorphisms of platelet adhesive molecules: association with breast cancer risk and clinical presentation. *Breast Cancer Res Treat* 80:145-154.
- Barth H, Schäfer C, Adah MI, Zhang F, Linhard RJ, Toyoda H, Kinoshita-Toyoda A, Toida T, Van Kuppevelt TH, Depla E, Von Weizsacker F, Blum HE, Baumert TF. 2003. Cellular binding of hepatitis C virus envelope glycoprotein E2 requires cell surface heparin sulfate. *J Biol Chem* 278(42):41003-41012.
- Bussel J, Kaplan C. 1998. The fetal and neonatal consequences of maternal alloimmune thrombocytopenia (Review). *Baillieres Clin Haematol* 11:3911-3918.
- Cavanagh G, Dunn AN, Chapman CE, Metcalfe P. 1997. HPA genotyping by PCR sequence-specific priming (PCR-SSP): a streamlined method for rapid routine investigations. *Transfus Med* 7(1):41-45.
- Clemetson KJ. 2003. Platelet receptors and their role in diseases. *Clin Chem Lab Med* 41:253-260.
- García-Malo MD, Corral J, González M, Solano C, González-Conejero R, Caballero MD, Pérez R, Moraleda JM, Vicente V. 2004. Human platelet antigen systems in allogeneic peripheral blood progenitor cell transplantation: effect of human platelet antigen mismatch on platelet engraftment and graft-versus-host disease. *Transfusion* 44:771-776.
- Goutagny N, Fatmi A, De Ledinghen V, Penin F, Couzigou P, Ichauspe G. 2003. Evidence of viral replication in circulating dendritic cells during hepatitis C virus infection. *J Infect Dis* 187: 1951-1958.
- Hamaia S, Li C, Allain JP. 2001. The dynamics of hepatitis C virus binding to platelets and 2 mononuclear cell lines. *Blood* 98(8):2293-2300.
- Hüe S, Cacoub P, Renou C, Halfon P, Thibault V, Charlotte F, Picon M, Rifflet H, Piette JC, Pol S, Caillat-Zucman S. 2002. Human leukocyte antigen class II alleles may contribute to the severity of hepatitis C virus related liver disease. *J Infect Dis* 186:106-109.



- Iniesta JA, González-Conejero R, Piqueras C, Vicente V, Corral J. 2004. Platelet GP IIIa polymorphism HPA-1 (P1A) protects against subarachnoid hemorrhage. *Stroke* 35:2282-2286.
- Jurado A, Cárđaba B, Jara P, Cuadrado P, Hierro L, de Andrés B, Del Pozo V, Cortegano MI, Gallardo S, Camarena C, Bárcena R, Castañer JL, Alvarez R, Lahoz C, Palomino P. 1997. Autoimmune hepatitis type 2 and hepatitis C virus infection: study of HLA antigens. *J Hepatol* 26(5):983-991.
- Kalb R, Santoso S, Unkelbach K, Kiefel V, Mueller-Eckhardt C. 1994. Localization of the Br polymorphism on a 144bp exon of the GPIa gene and its application for platelet DNA typing. *Tromb Haemost* 71:651-654.
- Klüter H, Fehlau K, Panzer S, Kirchner H, Bein G. 1996. Rapid typing for human platelet antigen systems-1, -2, -3 and -5 by PCR amplification with sequence-specific primers. *Vox Sang* 71(2):121-125.
- Kunicki TJ, Newman PJ. 1992. The molecular immunology of platelet proteins. *Blood* 80:1386-1404.
- Lauer GM, Walker BD. 2001. Hepatitis C virus infection. *N Engl J Med* 345:41-52.
- Metcalf P, Watkins NA, Ouwehand WH, Kaplan C, Newman P, Kekomaki R, De Haas M, Aster R, Shibata Y, Smith J, Kiefel V, Santoso S. 2003. Nomenclature of human platelet antigens. *Vox Sang* 85:240-245.
- Metcalf P. 2004. Platelet antigens and antibody detection. *Vox Sang* 87(Suppl. 1):S82-S86.
- Minton EJ, Smillie D, Neal KR, Irving WL, Underwood JC, James V. 1998. Association between MHC Class II alleles and clearance of circulating hepatitis C virus. *J Infect Dis* 178:39-44.
- Muller HM, Pfaff E, Goeser T, Kallinowski B, Solbach C, Thielman L. 1995. Peripheral blood leukocytes serve as a possible extra hepatic site for hepatitis C virus replication. *J Gen Virol* 74:669.
- Muller-Eckhardt C, Kiefel V, Santoso S. 1990. Review and update of platelet alloantigen systems. *Transfus Med* 4:98.
- Pavio N, Lai MMC. 2003. The hepatitis C virus persistence: how to evade the immune system? *J Biosci* 28(3):287-304.
- Pugliese A, Gennero L, Cutufia M, Enrietto M, Morra E, Pescarmona P, Ponzetto A. 2004. HCV infective virions can be carried by human platelets. *Cell Biochem Funct* 22:353-358.
- Reiner AP, Kumar PN, Schwartz SM, Longstreth WT Jr, Pearce RM, Rosendaal FR, Psaty BM, Siscovick DS. 2000. Genetic variants of platelet glycoprotein receptors and risk of stroke in young women. *Stroke* 31:1628-1633.

- Ridker PM, Hennekens CH, Schmitz C, Stampfer MJ, Lindpaintner K. 1997.  $PI^{A1/A2}$  polymorphism of platelet glycoprotein IIIa and risks of myocardial infarction, stroke and venous thrombosis. *Lancet* 349:385-388.
- Rosenberg N, Zivelin A, Chetrit A, Dardik R, Kornbrot N, Freimark D, Inbal A. 2002. Effects of platelet membrane glycoprotein polymorphisms on the risk of myocardial infarction in young males. *IMAJ* 4:411-414.
- Thursz M, Yallop R, Goldin R, Trepo C, Thomas HC. 1999. Influence of MHC class II genotype on outcome of infection with hepatitis C virus. *Lancet* 354:2119-2124.

# *Capítulo III*

---

Artigo a ser submetido para publicação na revista "Tissue Antigens"

## **Human platelet antigens-1, -3, -4 and -5 and liver fibrosis in HCV- infected patients**

### **ABSTRACT**

Hepatic fibrosis leading cirrhosis in 20 to 30% of patients with chronic hepatitis C virus (HCV) infection. Rapid progression to fibrosis has been related to environmental, viral and host factors. However, genetic polymorphisms have recently been associated with this progression, including the expression of integrins. Platelet membrane glycoproteins express several polymorphic antigenic determinants on their surface, which are called human platelet antigens (HPA). HPA-1, -3, -4 and -5 reside in integrins. The association between HPA antigens and stage of fibrosis can determine if HPA is related to progression of fibrosis. Thus, the goal of this study was to determine the association between the HPA-1, -3, -4 and -5 and the liver fibrosis stage in 175 HCV-infected patients. HPA-1, -3 and -4 genotyping was performed by PCR-SSP and, HPA-5 by PCR-RFLP. Fibrosis progression was evaluated using the METAVIR scoring system. There were no significant differences ( $p>0.05$ ) in allelic and genotypic frequency distribution of HPA-1, -3 and -5, residing in integrins.

## INTRODUCTION

Hepatic fibrosis leading cirrhosis in 20 to 30% of patients with chronic hepatitis C virus (HCV) infection (1). Fibrosis consists of a tissue scar due to the accumulation of extracellular matrix at the site of hepatic injury (2,3). Initially, in the first stages of fibrosis, hepatic function is conserved and few people have symptoms. On the other hand, as the inflammation continues the fibrotic scar grows, compromising hepatic functions. Thus, the stage of fibrosis is useful in evaluating the progression of the infection (4).

Rapid progression of fibrosis has been related to sex, age at time of infection, time of infection, alcohol use, coinfection with human immunodeficiency virus (HIV) and hepatitis B virus (HBV), *diabetes mellitus* and obesity (5-7).

Although the factors leading to progression of fibrosis are still unclear, studies have demonstrated the influence of viral and host factors in this process (1,8-11).

Host factors include, besides human leukocyte antigen (HLA), genetic polymorphisms that have been related to the progression of fibrosis in HCV-infected patients, such as polymorphism in the genes of interleukin-10 (IL-10), tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), angiotensinogen, and transforming growth factor- $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1) (1). Along this line, the expression of integrins has been associated with progression of fibrosis (12,13).

Although the target cell of HCV is the hepatocyte (14), viral RNA has been found associated with platelets (15-19). Platelet membrane glycoproteins express several polymorphic antigenic determinants on their surface, which are called human platelet antigens (HPA) (20). Polymorphism in most of these antigens is due to the substitution of a single amino acid in the protein, caused by a single nucleotide substitution in the gene which encodes the membrane glycoprotein. These amino acid mutations lead to

conformational alterations in the three-dimensional structure of the glycoprotein (21). Among the well-established HPA systems are HPA -1, -2, -3, -4 and -5 (22), which all except HPA-2 reside in integrins (21). Integrins are a family of heterodimeric transmembrane cellular receptors that mediate cell-cell and cell-extracellular matrix (ECM) interactions (23).

Interestingly, Verdichio-Moraes et al. (24) demonstrated an increased allelic frequency of HPA-5b in HCV-infected individuals when compared with a control group, suggesting a possible association between this allele and viral infection.

Thus, the association between HPA antigens and stage of fibrosis can determine if HPA is related to progression of fibrosis and if there is an HPA profile more frequently associated with this progression. The goal of this study was to determine the association between the HPA-1, -3, -4 and -5 systems and the liver fibrosis stage in HCV-infected patients.

## **PATIENTS AND METHODS**

Peripheral venous blood samples were collected from 175 HCV-infected patients seen in the Department of Internal Medicine – Gastroenterology Division, Botucatu Medical School, University of São Paulo State - UNESP, Botucatu, SP, Brazil. Inclusion criteria were: presence of RNA-HCV confirmed by molecular assays, with liver biopsy performed before the start of antiviral treatment, and signed informed consent. Exclusion criteria were: patients with HBV- or HIV-positive serology, antiviral treatment before the liver biopsy, and the presence of other hepatic diseases.

Genomic DNA was isolated from whole blood using a commercial Brasília kit (LGC Biotecnologia, Brazil), according to the manufacturer's instructions. HPA-1 and -3 were genotyped by PCR-SSP according to Klüter et al. (25), and HPA-4 by PCR-SSP according to Cavanagh et al. (26). C-

reactive protein gene (CRP) was used as internal positive control in all reactions using the primers described by Klüter et al. (25). The HPA-5 system was genotyped by PCR-RFLP according to Kalb et al. (27). A negative control was performed in all PCR runs. The primer sequences used in the PCR reactions are shown in Appendix 1.

Liver biopsies were performed using the Menghini or Tru-Cut needle. The fragments were analyzed when at least eight portal spaces were present. The tissue was submitted to hematoxylin-eosin, Masson trichrome, and reticulin staining. The biopsies were analyzed by a pathologist, using the METAVIR scoring system (4): F0 - no fibrosis, F1 - portal fibrosis without septa, F2 - portal fibrosis with few septa, F3 - numerous septa without cirrhosis, and F4 - cirrhosis.

The patients were separated into two groups, according to liver fibrosis stage (METAVIR scoring system): G1, patients with F0 or F1 or F2; G2, patients with F3 or F4.

The HPA-1, -3 and -5 systems were also analyzed considering the set of alleles of each patient.

Statistical analyses were performed using the GraphPad InStat Program<sup>®</sup>. The chi-square test or Fisher's exact test was used to investigate possible associations between HPA alleles and fibrosis stage (G1 or G2). The analyses of the combined alleles were carried out by the proportional hazards model. The significance level for all statistical tests was set at 0.05.

## RESULTS AND DISCUSSION

Of 175 patients, 102 were assigned to Group 1 (G1 – moderate fibrosis) and 73 to Group 2 (G2 – advanced fibrosis). Table 1 shows the allelic and genotypic frequencies of the HPA-1, -3 and -5 systems in G1 and G2. No patients were detected with the presence of allele b in the HPA-4 system.

The frequencies of the HPA-1, -3 and -5 systems combined were tested between the groups of patients and did not show a statistically significant difference ( $p < 0.05$ ) (data not shown).

**Table 1** Allelic and genotypic frequencies of the HPA-1, -3 and -5 systems in Group 1 (n=102) and Group 2 (n=73),  $p < 0.05$ .

	<b>G1</b>	<b>G2</b>	
<b>Alleles HPA</b>	<b>Alleles (%)</b>	<b>Alleles (%)</b>	<b>p Value</b>
1a	181 (88.7)	127 (87.0)	0.6215
1b	23 (11.3)	19 (13.0)	
3a	148 (72.5)	98 (67.1)	0.2734
3b	56 (27.5)	48 (32.9)	
5a	174 (85.3)	127 (87.0)	0.6528
5b	30 (14.7)	19 (13.0)	
<b>Genotypes HPA</b>	<b>Patients (%)</b>	<b>Patients (%)</b>	<b>p Value</b>
1a/1a	84 (82.4)	56 (76.7)	0.3624
1a/1b	13 (12.8)	15 (20.5)	
1b/1b	5 (4.8)	2 (2.8)	
3a/3a	57 (55.9)	36 (49.3)	0.5971
3a/3b	34 (33.3)	26 (35.6)	
3b/3b	11 (10.8)	11 (15.1)	
5a/5a	73 (71.5)	54 (74.0)	0.9205
5a/5b	28 (27.5)	19 (26.0)	
5b/5b	1 (1.0)	0	



Liver fibrosis results from the accumulation of extracellular matrix proteins in patients with chronic liver injury (3,28). Cirrhosis is a consequence of fibrosis progression that occurs in HCV infection (3,29). The development of fibrosis (fibrogenesis) is complex, and there are some profibrogenic cytokines involved in this process, such as TGF- $\beta$ 1 which is released in inflammation, tissue regeneration and fibrogenesis (30,31). Studies have demonstrated the participation of integrins in the regulation of the activities of hepatic stellate cells (HSC), such as contraction, migration, proliferation and synthesis of extracellular matrix (32,33) and also in the activation of TGF- $\beta$ 1.  $\alpha$ v $\beta$ 6 integrin acts as a receptor for the activation of latent TGF- $\beta$ 1 (34,35),  $\alpha$ v $\beta$ 3 integrin causes downregulation of TGF- $\beta$ 1 (36), and  $\alpha$ v $\beta$ 1 integrin also has the capacity to bind to latent TGF- $\beta$  (34).

Although the progression of fibrosis is dependent on environmental (5-7), viral and host factors (1,8-11), several genetic polymorphisms have been related to this progression (1). Alterations in the expression of the TGF- $\beta$ 1 (1) and  $\alpha$ v $\beta$ 6 integrin genes have already been associated with fibrosis progression. The expression of this integrin has been shown to be upregulated in experimental models of liver fibrosis and human liver fibrosis, correlating with fibrogenic activity and fibrosis stage (13). Along this line, another study has demonstrated that the upregulation of  $\beta$ 1-integrins is related to the fibrotic process (12).

Therefore, other integrins could be involved in the progression of fibrosis. Recently, Verdichio-Moraes et al. (24) demonstrated an association between the HPA-5b allele and the presence of HCV. The HPA-5 system resides in a platelet membrane glycoprotein, GPIa ( $\alpha$ 2) (20), which is a protein from the integrin superfamily, linked to  $\beta$ 1 (GPIIa) integrin (21). The glycoprotein complex GPIa/IIa ( $\alpha$ 2 $\beta$ 1) is one of the collagen receptors (37), one of the proteins that are present in the extracellular matrix. This complexo is also expressed in hepatic stellate cells (HSC), along with other

integrins (23). Alterations in the integrins in which HPAs are expressed could influence the fibrotic process.

There were no significant differences ( $p > 0.05$ ) in allelic and genotypic frequency distribution of HPA-1, -3 and -5 between G1 and G2. The absence of statistical significance could have been due to the lower frequency of allele b in the population studied.

**REFERENCES**

1. Powell EE, Edwards-Smith CJ, Hay JL et al. Host genetic factors influence disease progression in chronic hepatitis C. *Hepatology* 2000: **31**: 828-33.
2. Poynard T, Ratziu V, Charlotte F et al. Rates and risk factors of liver fibrosis progression in patients with chronic hepatitis C. *J Hepatol* 2001: **34**: 730-9.
3. Friedman SL. Liver fibrosis - from bench to bedside. *J Hepatol* 2003: **38**(Suppl. 1): S38-53.
4. Poynard T, Bedossa P, Opolon P, for the OBSVIRC, METAVIR, CLINIVIR, and DOSVIRC groups. Natural history of liver fibrosis progression in patients with chronic hepatitis C. *Lancet* 1997: **349**(9055): 825-32.
5. Poynard T, Ratziu V, Benmanov Y et al. Fibrosis in the patients with chronic hepatitis C: detection and significance. *Semin Liver Dis* 2000: **20**(1): 47-55.
6. Freeman AJ, Dore GJ, Law MG et al. Estimating progression to cirrhosis in chronic hepatitis C virus infection. *Hepatology* 2001: **34**(4): 809-16.
7. Seef LB. Natural history of chronic hepatitis C. *Hepatology* 2002: **36**(Suppl 1): S35-46.
8. Thorburn D, Curry G, Spooner R et al. The role of iron and haemochromatosis gene mutations in the progression of liver disease in chronic hepatitis C. *Gut* 2002: **50**: 248-52.
9. Wright M, Goldin R, Hellier S et al. Factor V Leiden polymorphism and the rate of fibrosis development in chronic hepatitis C virus infection. *Gut* 2003: **52**: 1206-10.
10. Yee LJ. Host genetic determinants in hepatitis C virus infection. *Genes Immun* 2004: **5**: 237-45.
11. Poujol-Robert A, Boëlle PY, Wendum D et al. Association between ABO blood group and fibrosis severity in chronic Hepatitis C infection. *Dig Dis Sci* 2006: **51**: 1633-6.

12. Nejjari M, Couvelard A, Mosnier JF et al. Integrin up-regulation in chronic liver disease: relationship with inflammation and fibrosis in chronic hepatitis C. *J Pathol* 2001; **195**: 473–81.
13. Popov Y, Patsenker E, Stickel F et al. Integrin  $\alpha v \beta 6$  is a marker of the progression of biliary and portal liver fibrosis and a novel target for antifibrotic therapies. *J Hepatol* 2008; **48**: 453–64.
14. Pavio N, Lai MMC. The hepatitis C virus persistence: how to evade the immune system? *J Biosci* 2003; **28**(3): 287-304.
15. Hernandez F, Blanquer A, Linares M et al. Autoimmune thrombocytopenia associated with hepatitis C virus infection. *Acta Haematol* 1998; **99**(4): 217-20.
16. Jimenez-Saenz M, Carmona Soria I, Caunedo Alvarez A et al. Absence of antiviral activity of high-dose subcutaneous beta-interferon in patients with chronic infection by genotype 1 virus C hepatitis. *Med Clin (Barc)* 2000; **114**(18): 717.
17. Hamaia S, Li C, Allain JP. The dynamics of hepatitis C virus binding to platelets and 2 mononuclear cell lines. *Blood* 2001; **98**(8): 2293-300.
18. Almeida AJ, Campos-de-Magalhães M, Melo Marçal OP et al. Hepatitis C virus-associated thrombocytopenia: a controlled prospective, virological study. *Ann Hematol* 2004; **83**(7): 434-40.
19. Pugliese A, Gennero L, Cutufia M et al. HCV infective virions can be carried by human platelets. *Cell Biochem Funct* 2004; **22**: 353-8.
20. Bussel J, Kaplan C. The fetal and neonatal consequences of maternal alloimmune thrombocytopenia (Review). *Baillieres Clin Haematol* 1998; **11**: 3911-8.
21. Metcalfe P, Watkins NA, Ouwehand WH et al. Nomenclature of human platelet antigens. *Vox Sang* 2003; **85**: 240-5.
22. Kunicki TJ, Newman PJ. The molecular immunology of human platelet proteins. *Blood* 1992; **80**: 1386-404.
23. Carloni V, Romanelli RG, Pinzani M, et al. Expression and function of integrins receptors for collagen and laminin in cultured human hepatic stellate cells. *Gastroenterol* 1996; **110**: 1127-36.

24. Verdichio-Moraes CF, Toralles-Pereira C, Grotto RMT et al. Allelic frequencies of HPA-1 to 5 human platelet antigens in patients infected with hepatitis C virus. *J Med Virol* 2009: **81**(4):757-9.
25. Klüter H, Fehlau K, Panzer S et al. Rapid typing for human platelet antigen systems-1, -2, -3 and -5 by PCR amplification with sequence-specific primers. *Vox Sang* 1996: **71**(2): 121-5.
26. Cavanagh G, Dunn AN, Chapman CE et al. HPA genotyping by PCR sequence-specific priming (PCR-SSP): a streamlined method for rapid routine investigations. *Transfus Med* 1997: **7**(1): 41-5.
27. Kalb R, Santoso S, Unkelbach K et al. Localization of the Br polymorphism on a 144bp exon of the GPIa gene and its application for platelet DNA typing. *Tromb Haemost* 1994: **71**: 651-4.
28. Bataller R, Brenner DA. Liver fibrosis. *J Clin Invest* 2005: **115**: 209-18.
29. Gines P, Cardenas A, Arroyo V et al. Management of cirrhosis and ascites. *N Engl J Med* 2004: **350**: 1646-54.
30. Friedman SL. Molecular regulation of hepatic fibrosis, an integrated cellular response to tissue injury. *J Biol Chem* 2000: **275**: 2247-50.
31. Bissell DM, Roulot D, George J. Transforming growth factor- $\beta$  and the liver. *Hepatology* 2001: **34**: 859-67.
32. Schuppan D, Ruehl M, Somasundaram R, et al. Matrix as a modulator of hepatic fibrogenesis. *Semin Liver Dis* 2001: **21**: 351-72.
33. Pinzani M, Marra F. Cytokine receptors and signaling in hepatic stellate cells. *Semin Liver Dis* 2001: **21**: 397-416.
34. Munger JS, Huang X, Kawakatsu H et al. The integrin alpha v beta 6 binds and activates latent TGF beta 1: a mechanism for regulating pulmonary inflammation and fibrosis. *Cell* 1999: **96**: 319-28.
35. Morris DG, Huang X, Kaminski N et al. Loss of integrin alpha(v)beta6-mediated TGF-beta activation causes Mmp12-dependent emphysema. *Nature* 2003: **422**: 169-73.

36. Patsenker E, Popov Y, Wiesner M, et al. Pharmacological inhibition of the vitronectin receptor abrogates PDGF-BB-induced hepatic stellate cell migration and activation in vitro. *J Hepatol* 2007; **46**: 878-87.
37. Heemskerk JW, Kuijpers MJ, Munnix IC, et al. Platelet collagen receptors and coagulation. A characteristic platelet response as possible target for antithrombotic treatment. *Trend Cardiovasc Med* 2005; **15**(3): 86-92.

# *Capítulo IV*

---

Artigo em fase final de redação

## **Associação entre HPA-1, -3, -4 e -5 e resposta ao tratamento em pacientes infectados pelo Vírus da Hepatite C**

### **RESUMO**

A Hepatite C é uma das principais causas de doença crônica hepática. A combinação entre o interferon peguilado e a ribavirina tem sido considerado o padrão-ouro de tratamento para Hepatite C. A resposta ao tratamento vem sendo associada a fatores ambientais, do vírus e também do paciente, tais como polimorfismos genéticos dos antígenos leucocitários humanos (HLA), da interleucina-10 e do fator de necrose tumoral- $\alpha$ . Plaquetas possuem em suas membranas glicoproteínas que expressam segmentos protéicos polimórficos, os quais são chamados de antígenos plaquetários humanos (HPA). Os sistemas HPA-1, -3, -4 e -5 residem em integrinas, proteínas que possuem interações com interferon. O objetivo desse estudo foi avaliar a associação entre frequência dos HPA-1, -3, -4 e -5 e a resposta ao tratamento, em 138 pacientes tratados para Hepatite C. A genotipagem dos HPA-1, -3 e -4 foi realizada pela técnica de PCR-SSP e do HPA-5 pela PCR-RFLP. A genotipagem do HCV foi realizada através do Kit comercial INNO-LiPA<sup>®</sup> v.1.0 (Innogenetics, Ghent, Belgium), segundo as instruções do fabricante. Os pacientes foram divididos em grupos e subgrupos de acordo com o esquema terapêutico, a resposta ao tratamento e o genótipo do HCV. Os pacientes que possuíam o genótipo do HCV não-1 e que foram tratados com IFN- $\alpha$ +RBV, com falha terapêutica, apresentaram uma diferença estatística significativa ( $p < 0.05$ ) nas frequências alélicas e genótípicas do sistema HPA-3, com aumento do alelo 3b. O sistema HPA-3 está localizado em uma integrina que se liga a fibronectina, um receptor de interferon. Nesse contexto, a alteração conformacional glicoprotéica decorrente da presença do alelo HPA-3b, poderia estar associada à falha ao tratamento com IFN- $\alpha$ +RBV em pacientes portadores de genótipo viral não-1.



## INTRODUÇÃO

O Vírus da Hepatite C (HCV) é uma importante causa de doença crônica hepática. Cerca de 80 a 85% dos pacientes infectados pelo vírus evoluem para forma crônica da doença, sendo que 20% dos casos desenvolvem cirrose em 20 a 25 anos, podendo progredir para o desenvolvimento de carcinoma hepatocelular (HCC)<sup>1</sup>.

O objetivo do tratamento na Hepatite C crônica é a erradicação do vírus. A resposta ao tratamento é monitorada com exames que quantificam o RNA do HCV no plasma ou soro humanos. Níveis de RNA viral indetectáveis por pelo menos seis meses após o término do tratamento são indicativos de Resposta Viroológica Sustentada (RVS)<sup>2</sup>, que caracteriza sucesso terapêutico prevenindo contra o desenvolvimento de cirrose e HCC<sup>3</sup>.

A primeira droga utilizada no tratamento de pacientes infectados pelo HCV foi o interferon- $\alpha$  (IFN- $\alpha$ )<sup>4</sup>, o qual atua induzindo genes estimulados por interferon (ISG)<sup>5,6</sup>, levando a produção do interferon (IFN) endógeno<sup>7-9</sup>. O interferon endógeno é uma proteína com ação antiviral, antiproliferativa e imunomoduladora. Entretanto, com a utilização do interferon em esquema de monoterapia apenas 10-25% dos pacientes infectados com HCV respondem ao tratamento<sup>10</sup>. A introdução da ribavirina, um nucleosídeo sintético análogo da purina<sup>11</sup>, usada em combinação com interferon, aumentou os níveis de RVS<sup>12,13</sup>. Recentemente, a ligação de um polímero de polietilenoglicol (PEG) ao IFN (Peginterferon) levou ao aumento do tempo de meia-vida da molécula, conduzindo a uma supressão viral mais eficiente<sup>14,15</sup>. Assim, a combinação entre Peginterferon e ribavirina tem sido considerada o padrão-ouro no tratamento de Hepatite C<sup>16,17</sup>.

Estudos demonstram que a RVS pode ser influenciada por fatores ambientais, do vírus e do hospedeiro<sup>3</sup>. Fatores como ingestão de álcool, coexistência de outras doenças hepáticas, índice de massa corporal e raça, podem influenciar nas taxas de resposta ao tratamento<sup>18</sup>. Os fatores virais

incluem a alta taxa de replicação, que pode levar a mutações no vírus e originar quasiespécies; e o genótipo viral, uma vez que os genótipos 2 e 3 são considerados melhores respondedores a terapia do que os genótipo 1 e 4<sup>19</sup>.

Fatores genéticos do paciente também vêm sendo relacionados à resposta ao tratamento, tais como polimorfismos nos genes dos antígenos leucocitários humanos (HLA)<sup>20,21</sup>, da interleucina-10 e do fator de necrose tumoral- $\alpha$ <sup>3</sup>.

O RNA do HCV foi encontrado associado as plaquetas<sup>22-25</sup>, as quais expressam em suas membranas glicoproteínas que apresentam segmentos protéicos polimórficos chamados Antígenos Plaquetários Humanos (HPA)<sup>26</sup>. O polimorfismo, na maioria destes antígenos, é devido à substituição de um único aminoácido na proteína, causada pela substituição de um único nucleotídeo no gene que codifica a glicoproteína. Essas mutações de aminoácidos conduzem a alterações conformacionais na estrutura tridimensional destas glicoproteínas<sup>27</sup>. Os sistemas HPA mais estudados são os HPA-1, -2, -3, -4 e -5<sup>28</sup>, sendo que os sistemas HPA-1, -3, -4 e -5 residem em glicoproteínas da família das integrinas<sup>27</sup>. Integrinas pertencem a uma família de heterodímeros que se ligam ao colágeno<sup>29,30</sup> e atuam como mediadores de interações célula-célula e célula-matriz extracelular<sup>31</sup>.

Os antígenos HPAs têm sido associados a importantes doenças, tais como: púrpura pós-transfusional<sup>32</sup>, trombocitopenia aloimune neonatal<sup>33</sup>, infarto do miocárdio<sup>34</sup>, trombose<sup>35</sup>, entre outras. Recentemente, foi demonstrada a associação entre a infecção pelo HCV e o alelo HPA-5b<sup>36</sup>.

Estudos têm demonstrado que o interferon atua na expressão e ativação de integrinas<sup>37</sup>. Recentemente, a integrina  $\alpha$ 11 foi relacionada como sendo uma proteína estimulada por interferon tipo I<sup>38</sup>. Por outro lado, as integrinas também podem atuar na produção de interferons. Em células

NK (*Natural Killer Cells*), a ligação de integrinas  $\beta 1$  resulta na produção de IFN- $\gamma$ <sup>39</sup>.

Nesse contexto, a associação entre os antígenos HPA e a resposta ao tratamento pode determinar a existência de um perfil HPA mais frequentemente associado à RVS ou a falha de tratamento. O objetivo desse estudo foi avaliar a associação entre a frequência dos HPA-1, -3, -4 e -5 e a resposta ao tratamento em pacientes infectados pelo HCV.

## **PACIENTES E MÉTODOS**

Foram coletadas amostras de sangue periférico de 138 pacientes infectados pelo HCV, atendidos no Ambulatório de Hepatites da Disciplina de Gastroenterologia Clínica do Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP, Botucatu, SP, Brasil. Os critérios de inclusão foram: pacientes com presença do RNA-HCV confirmado por testes moleculares e que assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido. Critérios de exclusão: pacientes com sorologia positiva pra HBV ou HIV e com a presença de outras doenças hepáticas.

Os pacientes foram divididos em dois grupos de acordo com o esquema terapêutico: Grupo 1 (G1) – pacientes tratados com interferon- $\alpha$  (IFN- $\alpha$ ) e ribavirina (RBV) durante 24 semanas; Grupo 2 (G2) – pacientes tratados com peginterferon (IFN-Peg) e ribavirina durante 48 semanas. Dentro de cada grupo os pacientes foram classificados, ainda, de acordo com o genótipo do HCV (1 ou não-1) e, quanto à resposta terapêutica, RVS ou falha terapêutica (pacientes não-respondedores ou com recidiva após o término do tratamento).

As informações clínicas foram coletadas do prontuário do paciente.

A genotipagem dos sistemas HPAs foi realizada por metodologia *in house*. DNA genômico foi extraído de leucócitos utilizando o kit comercial Brasília (LGC Biotecnologia, Brazil), seguindo as instruções do fabricante. HPA-1 e -3 foram genotipados pela técnica de PCR-SSP de acordo com Klüter et al.<sup>40</sup>, e o sistema HPA-4 por PCR-SSP de acordo com Cavanagh et al.<sup>41</sup>. O gene da proteína C reativa (CRP) foi usado como controle interno positivo em todas as reações, utilizando *primers* descritos por Klüter et al.<sup>40</sup>. O sistema HPA-5 foi genotipado pela técnica de PCR-RFLP, de acordo com Kalb et al.<sup>42</sup>. Em todas as reações de PCR foi incluído um controle negativo. Os *primers* utilizados em ambas as técnicas estão descritos no anexo 1.

A genotipagem do HCV foi realizada utilizando o kit comercial INNO-LiPA<sup>®</sup> v.1.0 (Innogenetics, Ghent, Belgium), distribuído pela Siemens no Brasil, seguindo as instruções do fabricante. Essa genotipagem foi precedida pela extração do RNA viral presente no plasma do paciente, seguida de uma RT-PCR (*Reverse Transcription – Polymerase Chain Reaction*), realizadas pelo kit *Amplicor HCV Test version 2.0* (Roche Diagnostic Systems, Branchburg, N.J), também seguindo as instruções do fabricante.

As comparações entre as freqüências dos sistemas HPA-1, -3, -4 e -5 foram realizadas dentro de cada grupo e subgrupo, utilizando a diferença entre RVS e Falha Terapêutica (FT).

Os Sistemas HPA-1, -3 e -5 também foram analisados considerando o conjunto de alelos de cada paciente.

As análises estatísticas foram realizadas utilizando *GraphPad Instat Program*<sup>®</sup>. Os testes de Chi-quadrado ou Exato de Fisher foram usados para investigar possíveis associações entre os alelos HPA e a resposta ao tratamento. As análises dos alelos combinados foram realizadas pelo Modelo de Chances Proporcionais. O nível de significância adotado para os testes estatísticos foi de 0.05.

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Dos 138 pacientes, 55 pertenciam ao Grupo 1 (IFN- $\alpha$ +RBV) e 83 ao Grupo 2 (IFN-Peg+RBV). No Grupo 1, 19 pacientes possuíam o genótipo 1 do HCV e 36 possuíam o genótipo não-1 do vírus. No Grupo 2, o genótipo 1 do HCV estava presente em 72 pacientes, enquanto que o genótipo não-1 em 11 pacientes.

A Tabela 1 mostra a frequência alélica e genotípica dos sistemas HPA-1, -3 e -5, uma vez que todos os pacientes foram homozigotos (4a/4a) para a sistema HPA-4. Os pacientes foram classificados quanto ao tipo de tratamento, genótipo do HCV e resposta ao esquema terapêutico.

As frequências dos sistemas HPA-1, -3 e -5 combinadas foram testadas entre os grupos de pacientes, porém não apresentaram diferença estatística significativa ( $p > 0.05$ ) (dados não mostrados).

**Tabela 1:** Frequências alélicas e genótípicas dos sistemas HPA-1, -3 e -5 da população estudada, segundo os esquemas terapêuticos, a resposta ao tratamento e o genótipo viral,  $p < 0.05$ .

Tratamento	Grupo 1 (IFN- $\alpha$ +RBV)						Grupo 2 (IFN-Peg+RBV)					
	1			Não-1			1			Não-1		
Genótipos HCV	RVS (%)	FT (%)	P	RVS (%)	FT (%)	P	RVS (%)	FT (%)	P	RVS (%)	FT (%)	P
Alelos HPA	RVS (%)	FT (%)	P	RVS (%)	FT (%)	P	RVS (%)	FT (%)	P	RVS (%)	FT (%)	P
1a	2 (5.3)	33 (86.8)	0.8464	23 (31.9)	32 (44.5)	0.9626	63 (43.7)	71 (49.3)	0.2404	9 (40.9)	12 (54.6)	0.4545
1b	0	3 (7.9)		7 (9.7)	10 (13.9)		3 (2.1)	7 (4.9)		1 (4.5)	0	
3a	2 (5.3)	24 (63.1)	0.4623	27(37.5)*	24 (33.3)*	0.0021	49 (34.0)	50 (34.7)	0.1909	7 (31.8)	12 (54.6)	0.0779
3b	0	12 (31.6)		3 (4.2)*	18 (25.0)*		17 (11.8)	28 (19.5)		3 (13.6)	0	
5a	2 (5.3)	30 (78.9)	0.7055	29 (40.3)	36 (50.0)	0.1251	57 (39.6)	70 (48.6)	0.5311	9 (41.0)	11 (50.0)	0.7143
5b	0	6 (15.8)		1 (1.4)	6 (8.3)		9 (6.2)	8 (5.6)		1 (4.5)	1 (4.5)	
Genótipos HPA	RVS (%)	FT (%)	P	RVS (%)	FT (%)	P	RVS (%)	FT (%)	P	RVS (%)	FT (%)	P
1a/1a	1 (5.3)	15 (78.9)	1.000	11 (30.6)	12 (33.3)	0.0728	30 (41.7)	33 (45.8)	0.8462	4 (36.4)	6 (54.5)	0.4545
1a/1b	0	3 (15.8)		1 (2.8)	8 (22.2)		3 (4.2)	5 (6.9)		1 (9.1)	0	
1b/1b	0	0		3 (8.3)	1 (2.8)		0	1 (1.4)		0	0	
3a/3a	1 (5.3)	9 (47.3)	1.000	12 (33.4)*	8 (22.2)*	0.0287	19 (26.4)	18 (25.0)	0.4914	2 (18.2)	6 (54.5)	0.0606
3a/3b	0	6 (31.6)		3 (8.3)*	8 (22.2)*		11 (15.3)	14 (19.4)		3 (27.3)	0	
3b/3b	0	3 (15.8)		0	5 (13.9)		3 (4.2)	7 (9.7)		0	0	
5a/5a	1 (5.3)	12 (63.1)	0.6842	14 (38.9)	15 (41.7)	0.1114	24 (33.3)	31 (43.1)	0.3457	4 (36.4)	5 (45.4)	0.7273
5a/5b	0	6 (31.6)		1 (2.8)	6 (16.6)		9 (12.5)	8 (11.1)		1 (9.1)	1 (9.1)	
5b/5b	0	0		0	0		0	0		0	0	

\*Diferença Estatística Significante. Abreviações: RVS – Resposta Viroológica Sustentada; FT – Falha Terapêutica.

Quando se considera os pacientes do grupo 1, portadores de vírus de genótipo não-1, foi observado um aumento na frequência do alelo b do sistema HPA-3 ( $p < 0.05$ ). Quando foram consideradas as frequências genótípicas, no mesmo conjunto de pacientes, foi encontrada significância nos perfis HPA-3a/3b e HPA-3b/3b ( $p < 0.05$ ), sugerindo associação entre a presença do alelo HPA-3b e a falência do esquema terapêutico com interferon- $\alpha$  entre pacientes com HCV de genótipo não-1.

Embora a obtenção de RVS se encontre na dependência do esquema terapêutico utilizado e do genótipo viral, atualmente fatores genéticos do paciente vêm sendo associados com a resposta ao tratamento<sup>43</sup>. Além da influência genética dos alelos HLA de classe II no sucesso<sup>44</sup> e na falha<sup>45,46</sup> da terapia, polimorfismos genéticos no promotor da IL-10 foram associados com a obtenção de RVS entre pacientes infectados com vírus de genótipo 1. No mesmo sentido, polimorfismos no gene da IL-10 foram mais frequentes em pacientes com RVS<sup>47</sup>. SNPs (*Single Nucleotide Polymorphism*) no promotor do gene do INF- $\gamma$  já foram associados ao sucesso terapêutico<sup>48</sup>, assim como polimorfismos no gene SOCS3 (*Suppressor of Cytokine Signaling 3*), que regula a ativação da expressão do interferon- $\alpha$ <sup>49</sup>.

O tratamento baseado em interferons pode levar a uma indução dos genes estimulados por interferon em indivíduos cronicamente infectados. Genes envolvidos na produção de IFN, como IRF7 (*Interferon regulatory factor 7*) e RIG-I (*Retinoid acid-inducible gene-I*), são induzidos pelo tratamento, sugerindo que o tratamento com IFN pode auxiliar na produção do IFN endógeno pelo paciente<sup>50</sup>.

Os interferons são proteínas que participam da resposta imunológica, exercendo efeito antiviral e antiproliferativo. O efeito biológico do interferon nas células se encontra na dependência de sua interação com o receptor da superfície celular<sup>51</sup>.

Estudos demonstraram que o receptor do interferon consiste em uma proteína envolvida em processos de adesão celular, a fibronectina<sup>52</sup>. Essa proteína encontra-se ligada a glicoproteínas da família das integrinas<sup>53</sup>.

As integrinas, por sua vez, já foram associadas à infecção pelo HCV. Verdichio-Moraes et al.<sup>36</sup>, demonstraram um aumento na frequência alélica do HPA-5b, o qual reside no complexo glicoproteico GPIa/IIa ( $\alpha 2\beta 1$ ), em pacientes infectados pelo vírus.

O sistema HPA-3 reside no complexo glicoprotéico GPIIb/IIIa ( $\alpha \text{IIb}\beta 3$ ). O receptor GPIIb/IIIa reconhece a seqüência de aminoácidos RGD (Arginina-Glicina-Aspartato), que é o motivo de ligação de várias proteínas de adesão relacionadas à agregação plaquetária, entre elas a fibronectina<sup>53</sup>, um receptor de interferon<sup>52</sup>.

Nesse contexto, a alteração conformacional glicoprotéica decorrente da presença do alelo HPA-3b, poderia estar associada à falha ao tratamento com IFN+RBV em pacientes portadores de genótipo viral não-1.



## Referências

1. Seeff LB, Hoofnagle JH. National Institutes of Health Consensus Development Conference: management of hepatitis C: 2002. *Hepatology*. 2002;36:S1-2.
2. Dhumeaux D, Marcellin P, Lerebours E. Treatment of hepatitis C. The 2002 French consensus. *Gut*. 2003;52:1784-7.
3. Fargion S, Fracanzani AD, Valenti L. Treatment choices for people infected with HCV. *J Antimicrob Chem*. 2004;53:708-12.
4. Hoofnagle JH, Mullen KD, Jones DB, Rustgi V, Di Bisceglie A, Peters M, et al. Treatment of chronic non-A, non-B hepatitis with recombinant human alpha interferon. A preliminary report. *N Engl J Med*. 1986;315:1575-8.
5. Sen GC. Viruses and interferons. *Annu Rev Microbiol*. 2001;55:255-81.
6. Bekisz J, Schmeisser H, Hernandez J, Goldman ND, Zoon KC. Human interferons alpha, beta and omega. *Growth Factors*. 2004;22:243-51.
7. Gilmour KC, Reich NC. Signal transduction and activation of gene transcription by interferons. *Gene Expr*. 1995;5:1-18
8. De Veer MJ, Holko M, Frevel M, Walker E, Der S, Paranjape JM, et al. Functional classification of interferon-stimulated genes identified using microarrays. *J Leukoc Biol*. 2001;69:912-20.
9. Gale M Jr. Effector genes of interferon action against hepatitis C virus. *Hepatology*. 2002;36:S121-7.
10. Hoofnagle JH, Di Bisceglie AM. The treatment of chronic viral hepatitis. *N Engl J Med*. 1997;336:347-56.
11. McHutchison JG, Patel K. Future therapy of hepatitis C. *Hepatology*. 2002;36:S245-52.
12. McHutchison JG, Gordon SC, Schiff ER, Shiffman ML, Lee WM, Rustgi VK, et al. Interferon alfa-2b alone or in combination with ribavirin as

- initial treatment for chronic hepatitis C. Hepatitis International Therapy Group. *N Engl J Med*. 1998;339:1485–92.
13. Poynard T, Marcellin P, Lee SS, Niederau C, Minuk GS, Ideo G, et al. Randomised trial of interferon  $\alpha$ 2b plus ribavirin for 48 weeks or for 24 weeks versus interferon  $\alpha$ 2b plus placebo for 48 weeks for treatment of chronic infection with hepatitis C virus. *Lancet*. 1998;352:1426–32.
  14. Fried MW, Shiffman ML, Reddy KR, Smith C, Marinos G, Gonçales FL Jr, et al. Pegylated (40KDa) interferon alfa-2a (PEGASYS) in combination with ribavirin: efficacy and safety results from a phase III, randomised, actively-controlled, multicenter study. *Gastroenterology*. 2001;120:A55.
  15. Manns MP, McHutchison JG, Gordon SC, Rustgi VK, Shiffman M, Reindollar R, et al. Peginterferon alfa-2b plus ribavirin compared with interferon alfa-2b plus ribavirin for initial treatment of chronic hepatitis C: a randomized trial. *Lancet*. 2001;358:958–65.
  16. Di Bisceglie AM, Hoofnagle JH. Optimal therapy of hepatitis C. *Hepatology*. 2002;36:S121–7.
  17. Hoofnagle JH, Seeff LB. Peginterferon and ribavirin for chronic hepatitis C. *N Engl J Med*. 2006;355(23):2444-51.
  18. Yan KK, Guirgis M, Dinh T, George J, Dev A, Lee A, et al. Treatment responses in Asians and Caucasians with chronic hepatitis C infection. *World J Gastroenterol*. 2008;14(21):3416-20.
  19. Farci P, Purcell RH. Clinical significance of hepatitis C virus genotypes and quasispecies. *Sem Liver Dis*. 2000;20:103–26.
  20. Thursz M, Yallop R, Goldin R, Trepo C, Thomas HC. Influence of MHC class II genotype on outcome of infection with hepatitis C virus. The HENCORE group. Hepatitis C European Network for Cooperative Research. *Lancet*. 1999;354:2119–24.

21. Patel K, Norris S, Lebeck L, Feng A, Clare M, Pianko S, et al. HLA Class I allelic diversity and progression of fibrosis in patients with chronic Hepatitis C. *Hepatology*. 2006;43:241-9.
22. Hernandez F, Blanquer A, Linares M, Lopez A, Tarin F, Cervero A. Autoimmune thrombocytopenia associated with hepatitis C virus infection. *Acta Haematol*. 1998;99(4):217-20.
23. Hamaia S, Li C, Allain JP. The dynamics of hepatitis C virus binding to platelets and 2 mononuclear cell lines. *Blood*. 2001;98(8):2293-300.
24. Almeida AJ, Campos-de-Magalhães M, Melo Marçal OP, Brandão-Mello CE, Okawa MY, Oliveira RV, et al. Hepatitis C virus-associated thrombocytopenia: a controlled prospective, virological study. *Ann. Hematol*. 2004;83(7):434-40.
25. Pugliese A, Gennero L, Cutufia M, Enrietto M, Morra E, Pescarmona P, et al. HCV infective virions can be carried by human platelets. *Cell Biochem Funct*. 2004;22:353-8.
26. Bussel J, Kaplan C. The fetal and neonatal consequences of maternal alloimmune thrombocytopenia (Review). *Baillieres Clin Haematol*. 1998;11:3911-8.
27. Metcalfe P, Watkins NA, Ouwehand WH, Kaplan C, Newman P, Kekomaki R, et al. Nomenclature of human platelet antigens. *Vox Sang*. 2003;85:240-5.
28. Kunicki TJ, Newman PJ. The molecular immunology of human platelet proteins. *Blood*. 1992;80:1386-404.
29. Lehnert K, Ni J, Leung E, Gough SM, Weaver A, Yao WP, et al. Cloning, sequence analysis, and chromosomal localization of the novel human integrin alpha11 subunit (ITGA11). *Genomics*. 1999;60:179-87.
30. Velling T, Kusche-Gullberg M, Sejersen T, Gullberg D. cDNA cloning and chromosomal localization of human alpha(11) integrin. A collagen-binding, I domain-containing, beta(1)-associated integrin

- alpha chain present in muscle tissues. *J Biol Chem.* 1999;274:25735-42.
31. Carloni V, Romanelli RG, Pinzani M, et al. Expression and function of integrins receptors for collagen and laminin in cultured human hepatic stellate cells. *Gastroenterology.* 1996;110:1127-36.
  32. Kroll H, Kiefel V, Santoso S. Clinical aspects and typing of platelet alloantigens. *Vox Sang.* 1998;74(Suppl 2):345-54.
  33. Ohto H. Neonatal alloimmune thrombocytopenia. *Nippon Rinsho.* 1997;55(9):2310-4.
  34. Ardissino D, Mannucci PM, Merlini PA, Duca F, Fetiveau R, Tagliabue L, et al. Prothrombotic genetic risk factors in young survivors of myocardial infarction. *Blood.* 1999;94(1):46-51.
  35. Santoro SA. Platelet surface collagen receptor polymorphisms: variable receptor expression and thrombotic/hemorrhagic risk. *Blood.* 1999;93(11):3575-7.
  36. Verdichio-Moraes CF, Toralles-Pereira C, Grotto RM, Silva GF, Pardini MI. Allelic frequencies of HPA-1 to 5 human platelet antigens in patients infected with hepatitis C virus. *J Med Virol.* 2009;81(4):757-9.
  37. Tenaud I, Leroy S, Chebassier N, Dreno B. Modulation in vitro of keratinocyte integrins by interferon-alpha and interferon-gamma. *Int J Dermatol.* 2002;41:836-40.
  38. Coelho LFL, Mota BEF, Sales PCM, Marques JT, Oliveira JG, Bonjardim CA, et al. Integrin alpha 11 is a novel type I interferon stimulated gene. *Cytokine.* 2006;33:352-61.
  39. Mainiero F, Gismondi A, Soriani A, Cippitelli M, Palmieri G, Jacobelli J, et al. Integrin-mediated ras-extracellular regulated kinase (ERK) signaling regulates interferon gamma production in human natural killer cells. *J Exp Med.* 1998;188:1267-75.

40. Klüter H, Fehlau K, Panzer S, Kirchner H, Bein G. Rapid typing for human platelet antigen systems-1, -2, -3 and -5 by PCR amplification with sequence-specific primers. *Vox Sang.* 1996;71(2):121-5.
41. Cavanagh G, Dunn AN, Chapman C, Metcalfe P. HPA genotyping by PCR sequence-specific priming (PCR-SSP): a streamlined method for rapid routine investigations. *Transfus Med.* 1997;7(1):41-5.
42. Kalb R, Santoso S, Unkelbach K, Kiefel V, Mueller-Eckhardt C. Localization of the Br polymorphism on a 144bp exon of the GPIa gene and its application for platelet DNA typing. *Tromb Haemost.* 1994;71:651-4.
43. Morgan TR, Lambrecht RW, Bonkovsky HL, Chung RT, Naishadham D, Sterling RK, et al. DNA polymorphisms and response to treatment in patients with chronic hepatitis C: Results from the HALT-C trial. *J Hepatol.* 2008;49(4):548-56.
44. Yee LJ, Im K, Wahed AS, Bugawan T, Li J, Rhodes S, et al. Polymorphism in the human MHC and the early viral decline during treatment of chronic hepatitis C. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009;53(2):615-21.
45. Korenaga M, Hino K, Okita K. A possible role of human leukocyte antigen (HLA) typing for predicting response to interferon therapy in chronic hepatitis C. *Nippon Rinshon.* 2001;59(7):1345-50.
46. Wawrzynowicz-Syczewska M, Underhill JA, Clare MA, Boron-Kaczmarek A, McFarlane IG, Donaldson PT. HLA class II genotypes associated with chronic hepatitis C virus infection and response to alpha-interferon treatment in Poland. *Liver.* 2000;20(3):234-9.
47. Yee LJ, Tang J, Gibson AW, Kimberly R, Van Leeuwen DJ, Kaslow RA. Interleukin-10 polymorphisms as predictors of sustained response in antiviral therapy for chronic hepatitis C infection. *Hepatology.* 2001;33:708-12.

48. Huang Y, Yang H, Borg BB, Su X, Rhodes SL, Yang K, et al. A functional SNP of interferon-gamma gene is important for interferon alpha-induced and spontaneous recovery from hepatitis C virus infection. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2007;104:985–90.
49. Persico M, Capasso M, Russo R, Persico E, Crocè L, Tiribelli C, et al. Elevated expression and polymorphisms of SOCS3 influence patient response to antiviral therapy in chronic hepatitis C. *Gut*. 2008;57:507–15.
50. Feld JJ, Nanda S, Huang Y, Chen W, Cam M, Susan N, et al. Hepatic Gene Expression During Treatment with Peginterferon and Ribavirin: Identifying Molecular Pathways for Treatment Response. *Hepatology*. 2007;46:1548-63.
51. Stiehm ER, Kronenberg LH, Rosenblatt HM, Bryson Y, Merigan TC. Interferon: Immunobiology and clinical significance. *Ann Int Med*. 1982;96:80-93.
52. Chill JH, Quadt SR, Levy R, Schreiber G, Anglister J. The human type I interferon receptor: NMR structure reveals the molecular basis of ligand binding. *Structure*. 2003;11:791-802.
53. Rozman P. Platelet antigens. The role of human platelet alloantigens (HPA) in blood transfusion and transplantation. *Transpl Immunol*. 2002;10(203):165-81.

# *Capítulo V*

---

Outros trabalhos que participei durante o doutorado



## Rede de Diversidade Genética de Vírus (VGDN)

A Rede de Diversidade Genética de Vírus, do inglês VGDN (*Viral Genetic Diversity Network*) foi uma rede de 22 laboratórios no Estado de São Paulo, estruturada e equipada com apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), a qual apresentou como principal objetivo estudar a diversidade genética dos vírus da Imunodeficiência Humana tipo I (HIV-1), da Hepatite C (HCV), Vírus Respiratório Sincicial (VRS) e Hantavirus em quatro tarefas coordenadas.

O laboratório de Biologia Molecular do Hemocentro de Botucatu, UNESP se inseriu neste contexto como laboratório integrante da rede e laboratório coordenados da primeira tarefa coordenada (HIV-1), iniciada em 2001 e finalizada em 2006.

Esta tarefa coordenada do Projeto VGDN compreende coleta de sangue e dados clínico-epidemiológicos, processamento e análise genômica de 1278 amostras de pacientes soropositivos para o HIV-1, que consentiram em participar, provenientes de oito cidades no Estado de São Paulo.

Na condição de membro do Laboratório de Biologia Molecular participei da execução desta tarefa coordenada, realizando os seguintes procedimentos:

**a) Separação das amostras coletadas:** A separação das amostras incluía 2 alíquotas de 1 mL de sangue total, 3 ou mais alíquotas de plasma, dependendo do hematócrito do paciente e uma fração rica em glóbulos brancos. Num prazo inferior a 5 horas, entre a coleta e o processamento, as alíquotas foram congeladas em freezer -80C ou -20C até o momento de serem transportadas para o Laboratório Central (Laboratório de Biologia Molecular – Hemocentro – Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP), onde permanece a -80C.



**b)Cadastramento das amostras:** registro em um banco de dados local desenvolvido para esta finalidade, o qual visou gerenciar o estoque de material e o fluxo das amostras.

**c)Armazenamento das amostras:** em freezer  $-80^{\circ}\text{C}$  até o momento do processamento.

**d)Extração de DNA:** alíquotas de DNA foram obtidas das amostras de sangue total utilizando o kit QIAmp DNA Blood<sup>®</sup> (Qiagen) seguindo as instruções do fabricante. Para verificar a qualidade da extração realizou-se uma eletroforese em gel de eletroforese a 2%.

**e)Distribuição das amostras:** distribuição das amostras extraídas aos laboratórios da Rede: as amostras extraídas foram fracionadas, acondicionadas em gelo seco e enviadas aos diferentes laboratórios da rede.

**f)Apoio técnico aos Laboratórios da Rede:** padronização de protocolos de reações de transcrição reversa, reação em cadeia da polimerase e seqüenciamento automático; recebimento de técnicos provenientes de outros serviços para treinamento e solução de problemas presentes nos respectivos laboratórios.

## **Análise comparativa das metodologias de hibridização reversa e seqüenciamento direto para a genotipagem do vírus da hepatite C**

Dissertação de mestrado desenvolvida pela aluna Patrícia Martinez Levada.

A identificação dos diferentes genótipos e subtipos do HCV tem sido útil para o entendimento da evolução da doença e da epidemiologia do vírus em relação a fatores de risco. Atualmente, os métodos de genotipagem assim como a região do genoma viral a ser utilizada constituem temas de discussão. O presente trabalho teve por objetivo comparar a metodologia de hibridização reversa (kit comercial INNO-LiPA<sup>®</sup> v.1.0) ao seqüenciamento direto das regiões *5'UTR*, *NS5B* e *core* do genoma do HCV. Foram utilizadas 92 amostras de plasma de pacientes do Ambulatório de Hepatites da Disciplina de Gastroenterologia Clínica da Faculdade de Medicina de Botucatu (UNESP). Dentre as 92 amostras constituintes deste trabalho, 64 foram selecionadas aleatoriamente e 28 foram escolhidas segundo a genotipagem prévia realizada com o kit INNO-LiPA<sup>®</sup> v.1.0. Dentre estas 28 amostras escolhidas, 10 foram genotipadas como 1a/1b, 2 como 2, 2 como 5, 7 apenas como 1 e 7 foram inconclusivas para a genotipagem com o kit comercial. A genotipagem por seqüenciamento direto foi efetuada seguindo as etapas de: extração do RNA viral, transcrição reversa, ampliações das regiões *5'UTR*, *NS5B* e *5'UTR-core* por *Nested-PCR*, reação de marcação fluorescente e eletroforese em aparelho automático 377 (*Applied Biosystems*). Todas as amostras puderam ser amplificadas para a região *5'UTR* e 62 para *NS5B*. Para as 30 amostras que não puderam ser amplificadas para *NS5B* foi realizada a amplificação da região *5'UTR-core* que se mostrou eficiente na amplificação de 28 (93%) das amostras. A análise de seqüência permitiu uma maior precisão na classificação viral. O seqüenciamento direto foi eficaz na solução de 100% dos resultados inconclusivos pela metodologia da hibridização reversa. Assim como já

reportado na literatura, o kit comercial INNO-LiPA<sup>®</sup> v.1.0 produziu resultados errôneos com relação a subtipagem do HCV, entretanto a genotipagem por seqüenciamento direto revelou também pelo menos uma troca de genótipo kit comercial, influenciando na conduta terapêutica e questionando a eficiência do método também quanto à determinação dos tipos virais.

*Anexos*

---

**Anexo 1:** Tabela com as seqüências dos *primers* utilizados para amplificação dos sistemas HPA-1 a -5.

<b>Sistemas</b>	<b>Primers</b>	<b>Seqüências</b>
HPA-1 <sup>(1)</sup>	HPA-1a-I Forward	ACT TAC AGG CCC TGC CTC T
	HPA-1b-I Forward	ACT TAC AGG CCC TGC CTC C
	HPA-1-II-common Reverse	GTG CAA TCC TCT GGG GAC T
HPA-2 <sup>(1)</sup>	HPA-2a-I Forward	CCC CCA GGG CTC CTG AC
	HPA-2b-I Forward	CCC CCA GGG CTC CTG AT
	HPA-2-II-common Reverse	GCC AGC GAC GAA AAT AGA GG
HPA-3 <sup>(1)</sup>	HPA-3a-I Forward	GGG GGA GGG GCT GGG GA
	HPA-3b-I Forward	GGG GGA GGG GCT GGG GC
	HPA-3-II-common Reverse	GGC CCT GGG ACT GTG AAT G
HPA-4 <sup>(2)</sup>	HPA-4a-I Forward	GCT GGC CAC CCA GAT GCG
	HPA-4b-I Forward	GCT GGC CAC CCA GAT GCA
	HPA-4-II-common Reverse	CAG GGG TTT TCG AGG GCC T
HPA-5 <sup>(3)</sup>	HPA-5-I Forward	GTG ACC TAA AGA AAG AGG
	HPA-5-II Reverse	CTC TCA TGG AAA ATG GCA G
Controle positivo <sup>(1)</sup>	CRP-I Forward	CCA GCC TCT CTC ATG CTT TTG GCC AGA CAG
	CRP-II Reverse	GGG TCG AGG ACA GTT CCG TGT AGA AGT GGA

(*Primers* descritos por Klüter et al., 1996<sup>1</sup>; *primers* descrito por Cavanagh et al., 1997<sup>2</sup>; *primers* descritos por Kalb et al., 1994<sup>3</sup>).

**Anexo 2:** Dados coletados durante a realização do projeto.

Os genótipos do Vírus da Hepatite C (HCV) estão divididos em 2 grupos: **1** - pacientes com genótipo 1; **2** pacientes com genótipos não-1 do HCV (genótipos 2, 3 e 5).

Quanto ao estadiamento da fibrose hepática os pacientes também foram divididos em 2 grupos: **1** - pacientes com F0, F1 e F2; **2** - pacientes com F3 e F4.

Em relação ao tratamento os pacientes foram classificados da seguinte forma: **1** - pacientes submetidos ao tratamento com IFN- $\alpha$ +RBV; **2** - pacientes tratados com IFN-Peg+RBV.

A resposta ao tratamento foi dividida em 3 grupos: **1** - pacientes com RVS; **2** - pacientes com recidiva; **3** - pacientes não-respondedores ao tratamento.

Nº Paciente	HPA 1	HPA 2	HPA 3	HPA 4	HPA 5	HCV Genót.	Fibrose	Tratam.	Resposta
001.01/04	1a	2ab	3a	4a	5a		1	1	1
002.01/04	1a	2a	3a	4a	5a		2	2	1
003.01/04	1a	2a	3ab	4a	5a	1	1	2	3
004.01/04	1ab	2a	3ab	4a	5a	1	1	2	3
005.01/04	1a	2a	3ab	4a	5ab		2	1	2
006.01/04	1a	2a	3b	4a	5a	1	1	1	3
007.01/04	1a	2a	3a	4a	5a		2	2	3
008.01/04	1a	2a	3ab	4a	5a		2	2	2
009.01/04	1a	2ab	3b	4a	5ab		1	2	2
010.01/04	1ab	2a	3a	4a	5a	1	1	2	3
011.01/04	1a	2a	3ab	4a	5a		1	2	2
012.01/04	1a	2a	3a	4a	5a		1	2	1
013.01/04	1a	2a	3ab	4a	5a		1	2	1
014.01/04	1a	2a	3a	4a	5ab	1	1	2	1
017.01/04	1a	2a	3a	4a	5a	1	2	1	3
018.01/04	1a	2a	3ab	4a	5a	1	1	2	1
019.01/04	1a	2a	3a	4a	5a		1	2	1
020.01/04	1a	2a	3a	4a	5a	2	1	2	1
021.01/04	1ab	2ab	3ab	4a	5ab		1	2	2
022.01/04	1a	2a	3a	4a	5a		1	2	1
023.01/04	1a	2ab	3a	4a	5a	1	1	2	1
024.01/04	1a	2a	3a	4a	5ab	1	1	2	2
025.01/04	1a	2a	3ab	4a	5a		1	2	2
026.01/04	1a	2a	3b	4a	5a		1	2	1
027.01/04	1a	2a	3a	4a	5ab	1	1	1	3
028.01/04	1a	2a	3a	4a	5a		1	2	1
029.01/04	1a	2a	3a	4a	5a	1	1	2	3

030.01/04	1ab	2ab	3a	4a	5a		1	2	1
031.01/04	1a	2a	3ab	4a	5ab		1	2	1
032.01/04	1a	2a	3a	4a	5ab		2	2	2
033.01/04	1a	2a	3a	4a	5a	1	1	2	1
034.01/04	1a	2a	3a	4a	5ab	2	1	1	3
035.01/04	1a	2a	3b	4a	5a		1	2	3
036.01/04	1ab	2a	3a	4a	5ab	1	1	2	1
038.01/04	1a	2a	3ab	4a	5a	1	1	2	1
039.01/04	1ab	2a	3a	4a	5a	1	2	1	3
040.01/04	1a	2a	3ab	4a	5a	1	1	2	1
041.01/04	1a	2a	3ab	4a	5a		1	2	3
042.01/04	1a	2a	3a	4a	5ab		2	2	3
043.01/04	1a	2a	3ab	4a	5a	1	2	1	3
044.01/04	1a	2a	3a	4a	5a	1	1	2	3
045.01/04	1a	2a	3ab	4a	5a	1	1	2	3
046.01/04	1a	2a	3ab	4a	5a	1	1	2	1
047.01/04	1a	2a	3a	4a	5a	1	1	2	1
048.01/04	1a	2a	3ab	4a	5a	1	1	2	1
049.01/04	1a	2a	3a	4a	5a			2	2
050.01/04	1a	2a	3a	4a	5ab		1	2	1
051.01/04	1a	2a	3a	4a	5a		2	2	3
052.01/04	1a	2a	3ab	4a	5a	1	1	2	2
053.01/04	1a	2a	3ab	4a	5b		1		
054.01/04	1a	2a	3ab	4a	5ab		2		
055.01/04	1a	2a	3ab	4a	5a		1	2	3
056.01/04	1a	2a	3a	4a	5ab		1	2	1
057.01/04	1a	2ab	3a	4a	5a		1	2	2
059.01/04	1a	2a	3b	4a	5ab		1	2	1
060.01/04	1a	2a	3b	4a	5a		1	2	1
062.01/04	1a	2a	3a	4a	5ab	1	1	2	2
063.01/04	1a	2a	3a	4a	5a		1	1	1
064.01/04	1ab	2ab	3ab	4a	5a	1	2	2	1
065.01/04	1a	2a	3a	4a	5a		1	1	3
066.01/04	1a	2a	3a	4a	5a		1	1	1
067.01/04	1a	2ab	3a	4a	5a	1	2	1	1
068.01/04	1a	2a	3b	4a	5a	2	1	1	2
069.01/04	1ab	2a	3ab	4a	5ab		2	1	3
070.01/04	1a	2a	3a	4a	5a	2	1	1	1
071.01/04	1a	2a	3ab	4a	5a		2	2	3
072.01/04	1a	2a	3a	4a	5a		2	1	2
074.01/04	1a	2a	3a	4a	5a		2	2	3

075.01/04	1a	2a	3a	4a	5a	1	2	1	1
076.01/04	1a	2a	3ab	4a	5a		1	1	2
077.01/04	1a	2a	3a	4a	5a		2	2	1
078.01/04	1ab	2a	3a	4a	5ab	2	1	1	2
079.01/05	1a	2a	3a	4a	5ab		1	1	3
080.01/05	1a	2a	3ab	4a	5a		2	1	2
081.01/05	1a	2a	3ab	4a	5ab		1	2	1
083.01/05	1b	2ab	3ab	4a	5a		1	2	1
084.01/05	1a	2a	3b	4a	5a		2	1	2
085.01/05	1b	2ab	3ab	4a	5ab			1	2
086.01/05	1a	2ab	3b	4a	5a		2		
087.01/05	1a	2a	3b	4a	5a		2	1	3
088.01/05	1a	2a	3a	4a	5a	1	2	1	2
091.01/05	1a	2a	3ab	4a	5a	2	1	1	1
092.01/05	1a	2a	3ab	4a	5a		1	1	2
093.01/05	1ab	2a	3ab	4a	5ab		2	1	3
094.01/05	1ab	2a	3b	4a	5ab		2	1	3
095.01/05	1a	2a	3a	4a	5a		2	1	1
096.01/05	1ab	2a	3a	4a	5ab	1	2	1	3
097.01/05	1a	2a	3a	4a	5a	1			
098.01/05	1a	2a	3a	4a	5a		2	1	1
100.01/05	1a	2a	3a	4a	5ab				
101.01/05	1ab	2a	3ab	4a	5a	1	2	1	3
102.01/05	1a	2a	3a	4a	5a		2	1	3
103.01/05	1a	2a	3a	4a	5a	2	1	1	1
105.01/05	1a	2a	3a	4a	5a	1	2	1	3
107.01/05	1a	2a	3a	4a	5ab	1	1	2	1
108.01/05	1a	2a	3ab	4a	5ab		2	1	3
109.01/05	1a	2ab	3b	4a	5a		2		
110.01/05	1ab	2a	3a	4a	5a		2	1	3
112.01/05	1b	2a	3a	4a	5a	2	1	1	1
113.01/05	1ab	2a	3b	4a	5a	2	1	1	2
114.01/05	1ab	2a	3a	4a	5ab		2	2	3
115.01/05	1a	2a	3a	4a	5a		1	1	3
116.01/05	1a	2a	3a	4a	5a	1	1	2	1
117.01/05	1a	2a	3ab	4a	5a		1	2	1
118.01/05	1ab	2ab	3a	4a	5a		2	1	3
119.01/05	1a	2ab	3b	4a	5ab		1	2	1
120.01/05	1ab	2a	3a	4a	5a	1	1		
121.01/05	1a	2a	3ab	4a	5a	1		2	1
122.01/05	1a	2a	3a	4a	5a	2	1		



123.01/05	1ab	2b	3a	4a	5a		1		
124.01/05	1a	2b	3a	4a	5a	1	1	2	3
125.01/05	1a	2a	3b	4a	5a				
131.01/05	1a	2b	3a	4a	5ab		1		
132.01/05	1a	2ab	3a	4a	5a		1	1	1
133.01/05	1a	2a	3ab	4a	5a	1	1	2	3
137.01/05	1a	2a	3a	4a	5a		1	1	1
138.01/05	1a	2a	3a	4a	5a	1	1	2	1
140.01/05	1a	2b	3a	4a	5a	2	1		
141.01/05	1a	2a	3ab	4a	5ab		1	2	3
142.01/05	1a	2a	3ab	4a	5ab		2		
143.01/05	1ab	2a	3a	4a	5a				
144.01/05	1a	2ab	3a	4a	5ab		1		
146.01/05	1a	2a	3ab	4a	5a	1	2	1	3
149.01/05	1a	2a	3a	4a	5a				
152.01/05	1a	2a	3a	4a	5ab	1	1		
153.01/05	1a	2a	3a	4a	5ab		2		
154.01/05	1ab	2a	3ab	4a	5a		2	1	3
155.01/05	1a	2a	3a	4a	5a		2	2	2
156.01/05	1a	2a	3b	4a	5a		2	2	2
157.01/05	1a	2a	3ab	4a	5ab	1	2		
158.01/05	1b	2a	3a	4a	5a		2	1	1
159.01/05	1a	2a	3ab	4a	5a		2	2	3
160.01/05	1ab	2ab	3a	4a	5a		1	1	1
166.01/05	1b	2a	3ab	4a	5a		1	2	3
168.01/05	1a	2ab	3a	4a	5a	1	2	2	2
174.01/05	1a	2a	3ab	4a	5ab				
175.01/05	1a	2a	3a	4a	5a		1	1	3
176.01/05	1a	2a	3b	4a	5a	1	2	2	3
177.01/05	1a	2a	3a	4a	5ab		1	1	1
178.01/05	1a	2a	3ab	4a	5ab		2	1	1
179.01/05	1a	2a	3b	4a	5a	1	2	2	3
180.01/05	1b	2a	3b	4a	5a		2		
181.01/05	1a	2a	3ab	4a	5ab		2	1	1
182.01/05	1a	2ab	3ab	4a	5a		2	1	3
185.01/05	1a	2a	3b	4a	5a		1	1	2
186.01/05	1a	2a	3a	4a	5a	1	1	2	1
188.01/05	1a	2a	3b	4a	5ab		1	2	1
189.01/05	1a	2a	3a	4a	5ab		2	1	3
190.01/05	1ab	2a	3ab	4a	5a	2	2	1	3
191.01/05	1a	2a	3a	4a	5a			1	3

192.01/05	1a	2a	3a	4a	5ab				
193.01/05	1a	2a	3b	4a	5a	1	2	2	3
194.01/05	1ab	2a	3b	4a	5a		2		
198.01/05	1a	2ab	3ab	4a	5a	2	1	1	1
199.01/05	1ab	2b	3ab	4a	5a	1	2	2	3
200.01/05	1a	2a	3a	4a	5a		2		
202.01/05	1a	2a	3a	4a	5a	2	2	2	3
203.01/05	1a	2a	3a	4a	5a	1		2	3
205.01/05	1a	2a	3a	4a	5ab	2	1	2	3
207.01/05	1a	2ab	3a	4a	5a		2	1	3
208.01/05	1a	2ab	3a	4a	5a		2	1	3
210.01/05	1b	2a	3a	4a	5a	2	1		
212.01/05	1a	2a	3a	4a	5a		2	1	3
213.01/05	1a	2a	3ab	4a	5a	1			
214.01/05	1a	2a	3ab	4a	5ab	1	1	2	1
215.01/05	1b	2a	3ab	4a	5a		1	1	1
216.01/05	1a	2a	3a	4a	5a	2	2	2	2
217.01/05	1ab	2a	3a	4a	5a	1	1		
218.01/05	1a	2a	3a	4a	5ab		2	2	1
219.01/05	1a	2a	3a	4a	5a		1	2	1
220.01/05	1ab	2ab	3b	4a	5a	1	2	1	3
221.01/05	1a	2a	3ab	4a	5a		2		
222.01/05	1ab	2a	3a	4a	5a		1	1	3
223.01/05	1a	2a	3b	4a	5a		2	2	2
226.01/05	1ab	2a	3ab	4a	5a		1		
230.01/05	1a	2a	3b	4a	5ab				
231.01/05	1a	2a	3ab	4a	5a	1	1	2	3
232.01/05	1a	2a	3a	4a	5a	2	1		
234.01/05	1a	2a	3ab	4a	5ab	1	1	1	3
235.01/05	1a	2a	3a	4a	5a	2	2	1	3
237.01/05	1a	2a	3a	4a	5ab	1	1		
238.01/05	1a	2a	3ab	4a	5a	1	2		
239.01/05	1a	2a	3a	4a	5a	1	1	2	2
240.01/05	1a	2a	3a	4a	5a		2	2	3
241.01/05	1a	2a	3a	4a	5a		1	1	3
242.01/05	1a	2a	3a	4a	5a				
243.01/05	1a	2a	3a	4a	5a				
244.01/05	1a	2a	3a	4a	5a		2	2	2
245.01/05	1a	2a	3a	4a	5a		2	2	3
246.01/05	1a	2a	3a	4a	5a	2	1	2	1
248.01/05	1a	2a	3ab	4a	5a		1	2	1