

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
FACULDADE DE MEDICINA DE BOTUCATU**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PESQUISA E
DESENVOLVIMENTO - BIOTECNOLOGIA MÉDICA
MESTRADO PROFISSIONAL**

Jovita Ramos Ariede

**AVALIAÇÃO DA CARGA VIRAL DO VÍRUS DA
HEPATITE C EM DIFERENTES COMPARTIMENTOS
BIOLÓGICOS: INFLUÊNCIA NA PREDIÇÃO DA
RECIDIVA VIROLÓGICA**

BOTUCATU

2013

Jovita Ramos Ariede

**AVALIAÇÃO DA CARGA VIRAL DO VÍRUS DA
HEPATITE C EM DIFERENTES COMPARTIMENTOS
BIOLÓGICOS: INFLUÊNCIA NA PREDIÇÃO DA
RECIDIVA VIROLÓGICA**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Botucatu - UNESP, Programa de Pós-Graduação em Pesquisa e Desenvolvimento-Biotecnologia Médica (Mestrado Profissional), do Hemocentro de Botucatu, para obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Rejane Maria Tommasini Grotto

Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Maria Inês de Moura Campos Pardini

BOTUCATU

2013

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO DE AQUIS. E TRAT. DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: *ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE*

Ariede, Jovita Ramos.

Avaliação da carga viral do vírus da hepatite C em diferentes compartimentos biológicos : influência na predição da recidiva virológica / Jovita Ramos Ariede. – Botucatu : [s.n.], 2012

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina de Botucatu

Orientador: Rejane Maria Tommasini Grotto

Coorientador: Maria Inês de Moura Campos Pardini

Capes: 20804008

1. Hepatite C. 2. Hepatite por vírus. 3. Plaquetas. 4. Virologia.

Palavras-chave: Carga viral; Plaquetas; Recidiva virológica; Vírus da hepatite C.

**ESTE TRABALHO FOI REALIZADO NO
LABORATÓRIO DE BIOLOGIA MOLECULAR
DO HEMOCENTRO DE BOTUCATU**

Dedicatória

Dedico este trabalho aos meus pais, Valentin e Zeti, e ao meu irmão Italo, pelo incentivo e apoio em todas as minhas escolhas e decisões.

A Vitória desta conquista dedico com todo meu amor, unicamente, a vocês! Vocês são eternos em meu coração.

Agradecimientos

Agradeço a Deus sempre presente na minha vida. Por guiar minha vida, meu caminho, minhas escolhas. Por me dar fortaleza, serenidade e humildade. Por me auxiliar a praticá-las e, a ser sempre confiante na sua vontade.

A Nossa Senhora, que sempre roga a Deus por seus filhos.

Ao meu pai Valentin, a minha mãe Zeti, ao meu irmão Italo, a minha cunhada Débora e todos da minha PRECIOSA FAMÍLIA, pela paciência, auxílio e incentivo em todos os momentos. Sem o apoio da família não somos nada!

Ao meu querido namorado, Adriano que sempre me apoiou e que esteve presente em cada momento desta caminhada, torcendo pelo meu êxito e me dando muita força desde o início desta trajetória. Obrigada por fazer parte da minha vida.

À minha orientadora, Dra. Rejane Maria Tommasini Grotto. Obrigada por sempre estar disposta a ajudar e auxiliar. Também agradeço pela confiança depositada no meu potencial, pelo estímulo ao crescimento profissional, pelos conselhos e por todos os ensinamentos.

À minha coorientadora, Dra. Maria Inês de Moura Campos Pardini. Por todas as oportunidades proporcionadas de fazer parte de seu grupo e por toda a formação que adquiri em seu laboratório.

Ao Dr. Giovanni Faria Silva, meu eterno agradecimento, pelos importantes ensinamentos na área clínica e por estar sempre disposto a me ensinar e apoiar.

Ao Programa de Pós-Graduação “Pesquisa e Desenvolvimento – Biotecnologia Médica” da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP.

Aos docentes do Programa de Mestrado Profissionalizante pelos ensinamentos.

A todos do Laboratório de Rotinas Diagnósticas em Biologia Molecular do Hemocentro: Sarita, Regina, Rosângela e Maércio. Obrigada pelos ensinamentos, pela paciência, auxílio com as amostras e com os exames.

Aos colegas do laboratório de Biologia Molecular do Hemocentro: Aline Aki, Aline Galvani, Sarita, Tainara, Natália Picelli, Natália Cantão, Gustavo, Lilian e Luciana. Muito obrigada pela força, pela amizade, pelos momentos de descontração e também pelas produtivas discussões. Agradeço pelo auxílio de todos.

Aos aprimorandos que cooperaram com o meu trabalho.

Às minhas queridas amigas, Aline Aki, Aline Galvani, Sarita, Tainara, Kyoto, Natália Picelli e Natália Cantão... grandes amigas e companheiras inseparáveis. Obrigada pelos momentos descontraídos, pela verdadeira amizade e por toda a força tanto nos bons momentos quanto nos mais difíceis. Muito obrigada por tudo!

A toda equipe do Dr. Giovanni, que foram solícitos ajudando na minha relação com os pacientes e que sempre estavam dispostos a fazer o que era possível para facilitar a coleta de dados.

Muito obrigada a todos os pacientes que cooperaram para a realização deste trabalho. Com eles aprendi muito sobre como trilhar a vida e como seguir em frente.

À secretária do programa, Janisse, pelo auxílio, pelas informações e por toda ajuda cedida.

A todos que, de alguma maneira, estiveram presentes no meu caminho e que influenciaram na minha chegada até aqui.

Epígrafe

“Ninguém caminha sem aprender a caminhar, sem aprender a fazer o caminho caminhado, sem aprender a refazer, a retocar o sonho, por causa do qual a gente se pôs a caminhar”

Paulo Freire

Prefácio

Biomédica de formação, ainda durante a graduação, tive a oportunidade de desenvolver um projeto Iniciação Científica.

No último semestre de graduação decidi que gostaria de atuar profissionalmente, então finalizei com êxito minha graduação e, trabalhei por um período de dois anos, no Laboratório de Análises Clínicas do Hospital da Unimed-Bauru, local onde adquiri vivência prática da profissão.

No período em que trabalhava, senti a necessidade de voltar a estudar para aprimorar meus conhecimentos teóricos e práticos na área de biologia molecular. Desta forma, minha opção foi ingressar no programa de Pós-Graduação em Pesquisa e Desenvolvimento - Biotecnologia Médica no conceituado Laboratório de Biologia Molecular da FMB/ Hemocentro de Botucatu.

O referido Laboratório tem, entre várias outras linhas, uma linha de pesquisa em Hepatite C, na qual me inseri, participando de Projetos de Pesquisa versando sobre Vírus da Hepatite C, Plaquetas e Antígenos Plaquetários Humanos (Human Platelets Antigens - HPA). Acompanhei todas as atividades de pesquisa desenvolvidas no referido laboratório onde consegui aprimorar meus conhecimentos práticos e teóricos durante todo o período. Foi uma oportunidade grandiosa para quem tem interesse na área de biologia molecular.

Seguindo esta linha, desenvolvi meu projeto de mestrado estudando a Avaliação da Carga Viral do Vírus da Hepatite C em diferentes compartimentos biológicos: Influência na predição da recidiva virológica.

Assim, o conteúdo apresentado neste volume é resultado de minha formação durante estes dois anos e se insere em uma linha de pesquisa pela qual muito me identifiquei.

O modelo escolhido para apresentação de meu trabalho foi em dois capítulos:

*O **Capítulo I** constitui o trabalho proposto por ocasião de meu ingresso no Programa de Pós-Graduação - Mestrado Profissional no qual me dediquei.*

*O **Capítulo II** consiste em um artigo intitulado “Human platelet antigen (HPA) genotype is associated with therapy failure in patients infected by HCV”, no qual participei com a coleta de dados laboratoriais constituindo o grupo dos pacientes infectados pelo HCV em recidiva virológica, submetido para publicação na revista “Journal of Medical Virology”.*

Jovita Ramos Ariede

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Esquema representativo do genoma do VHC, evidenciando os genes codificadores das proteínas estruturais e não estruturais e suas funções.

Figura 2: Representação esquemática do VHC, evidenciando o RNA viral, core e, as proteínas do envelope (E1 e E2).

Figura 3: Proteínas do VHC e pontos de clivagem.

Figura 4: Árvore filogenética representando os genótipos (representados por algarismos arábicos) e subtipos (representados por letras do alfabeto), de acordo com a sequência do genoma completo do VHC.

Figura 5: Níveis de RNA do VHC no plasma e associado à plaquetas para a primeira amostra determinados ao longo do tempo: em 0 (no momento da coleta) e depois de 48, 96, 144 horas de incubação à 37⁰C.

Figura 6: Níveis de RNA do VHC no plasma e associado à plaquetas para a amostra 2 determinados ao longo do tempo: em 0 (no momento da coleta) e depois de 48, 96, 144 horas de incubação à 37⁰C.

Figura 7: Níveis de RNA do VHC no plasma e associado à plaquetas para a amostra 3 determinados ao longo do tempo: em 0 (no momento da coleta) e depois de 48, 96, 144 horas de incubação.

Figura 8: Níveis de RNA do VHC no plasma e associado à plaquetas na 24^a semana depois do término da terapia antiviral para os cinco pacientes em recidiva virológica.

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

μL: Microlitro

° C: Graus Celsius

BOC: Boceprevir

CV: Carga Viral

E1: Glicoproteína 1 do envelope

E2: Glicoproteína 2 do envelope

EDTA: Ácido Etilenodiaminotetraacético

FAM: Sonda com repórter fluorescente 6-carboxifluoresceína

g: Grama

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

IFN-α: Interferon alfa recombinante

IgG: Imunoglobulina G

IRES: *Internal Ribosomal Entry Site*

Log: Logaritmo

LTR: *Long terminal repeat*

mg: Miligrama

mL: Mililitro

nm: Nanômetro

qPCR: PCR em Tempo Real

NS2: Proteína não estrutural 2 do genoma do VHC

NS3: Proteína não estrutural 3 do genoma do VHC

NS4A: Proteína não estrutural 4A do genoma do VHC

NS4B: Proteína não estrutural 4B do genoma do VHC

NS5A: Proteína não estrutural 5A do genoma do VHC

NS5B: Proteína não estrutural 5B do genoma do VHC

ORF: *Open Reading Frame*

OMS: Organização Mundial da Saúde

PCR: Reação em Cadeia da Polimerase

PEG-IFN: Interferon Peguilado

RBV: Ribavirina

RNA: Ácido Ribonucleico (*Ribonucleic Acid*)

RT-PCR: Reação de transcriptase reversa

RVF: Resposta virológica ao final do tratamento

RVP: Resposta virológica precoce

RVR: Resposta virológica rápida

RVS: Resposta Virológica Sustentada

TVR: Telaprevir

UI: Unidade internacional

UTR: Região não traduzida (*Untranslate region*)

VIC: sonda com repórter fluorescente 6-carboxi-4',7',2',7'-tetracloro-fluoresceína

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

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

SUMÁRIO

Capítulo I.....	17
Capítulo II.....	58
Artigo: Human platelet antigen (HPA) genotype is associated with therapy failure in patients infected by HCV.....	59
Anexo.....	75
Anexo 1: Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de Botucatu - UNESP.....	76
Anexo 2: Justificativa de Alteração no Título do Projeto de Pesquisa.....	77

Capítulo I

Avaliação da Carga Viral do Vírus da Hepatite C em diferentes compartimentos biológicos: influência na predição da recidiva virológica

RESUMO

INTRODUÇÃO: A detecção do RNA viral do VHC tem sido documentada em outros compartimentos biológicos além do soro e plasma de pacientes infectados pelo vírus, como nas plaquetas. No entanto, sua influência na terapia antiviral é desconhecida. Poucos estudos têm sido realizados na tentativa de avaliar a quantificação do RNA viral em outros compartimentos biológicos e a significância deste achado no resultado da terapia antiviral. Considerando que o VHC é carregado pelas plaquetas na circulação, a avaliação quantitativa do RNA viral neste compartimento biológico pode se mostrar distinta da observada no plasma.

OBJETIVOS: Realizar a avaliação comparativa *in vitro* do RNA do VHC plasmático e do RNA do VHC carregado à plaqueta e, realizar a avaliação comparativa da quantificação do RNA viral do VHC em plasma e plaquetas de pacientes com recidiva ao tratamento antiviral.

CASUÍSTICA E MÉTODOS: Amostras de sangue periférico provenientes de pacientes infectados pelo VHC foram utilizadas para realização de dois experimentos. Experimento *in vitro* (repetido em triplicata) consistiu na separação de quatro alíquotas da mesma amostra, as quais foram submetidas a incubação a 37°C por 30xg por diferentes intervalos de tempo (0, 48, 96, 144h) e, posteriormente separadas para obtenção de plasma e *pellet* de plaquetas. A partir de cada uma destas frações foi extraído RNA viral, o qual foi utilizado como fonte para qPCR. Experimento *in vivo*: Foram acompanhados pacientes que iniciaram e finalizaram a terapêutica entre janeiro de 2011 a julho de 2012 e, dentre estes, os que apresentaram recidiva virológica ao tratamento antiviral estabelecido. Dos pacientes em recidiva virológica foram processadas amostras para a obtenção do plasma e *pellet* de plaquetas em dois momentos: no momento da recidiva virológica e, no momento imediatamente anterior (12 semanas anteriores à recidiva). RNA viral extraído do plasma e *pellet* de plaquetas nestes dois momentos foi utilizado como fonte para qPCR. A análise estatística foi realizada pelo método *Least Squares Means* para comparar os resultados da quantificação do RNA viral no plasma e plaquetas dos pacientes em recidiva virológica.

RESULTADOS E DISCUSSÃO: Os resultados do experimento *in vitro* demonstraram que nas triplicatas realizadas embora o nível de RNA viral no plasma na amostra processada logo após a coleta foi superior ao observado nas plaquetas, com o passar do tempo os níveis de RNA viral plasmático foram declinando,

sugerindo uma degradação progressiva do RNA do VHC plasmático; enquanto que os níveis de RNA plaquetário se mantêm mais estáveis, sugerindo que o vírus carregado à plaqueta parece se preservar por mais tempo quando comparado ao livre no plasma. Os resultados do experimento in vivo mostraram que na semana que antecede a recidiva o RNA viral permanece indetectável tanto no plasma quanto na plaqueta e, que na semana da recidiva os níveis de RNA viral são superiores ($p=0,03$) no plasma, sugerindo que a plaqueta parece constituir um compartimento biológico com características distintas das do plasma

PALAVRAS-CHAVE: Vírus da Hepatite C, Plaquetas, Carga viral, Recidiva Viroológica.

1 INTRODUÇÃO

1.1 EPIDEMIOLOGIA DA HEPATITE C

A Hepatite C é uma doença hepática provocada por um vírus de tropismo hepático, denominado Vírus da Hepatite C (VHC) (LAUER; WALKER, 2001). A infecção pelo vírus constitui um grave problema de saúde mundial, devido ao seu grande potencial de evolução para cirrose e hepatocarcinoma (STRAUSS, 2001; SZABÓ et al., 2003; WHO, 2008). Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), estima-se que aproximadamente 180 milhões de pessoas, ou 3% da população mundial esteja infectada pelo VHC, sendo que 130 milhões com alto risco de desenvolver cirrose e/ou carcinoma hepatocelular. O VHC é responsável por 50% a 76% de todos os casos novos de hepatocarcinoma e, por dois terços dos transplantes hepáticos nos países desenvolvidos (LAUER; WALKER, 2001; WHO, 2008).

No Brasil, segundo o Ministério da Saúde, do total de casos de Hepatite C registrados entre 1999 e 2011 55.222 foram na região Sudeste e 18.307, na Sul. Em conjunto as regiões Sul e Sudeste representam 90% dos casos confirmados de Hepatite C nesse período no país (BRASIL, 2012).

A transmissão do vírus ocorre pelo contato com sangue infectado por exposição percutânea, transfusão de sangue e/ou hemoderivados, transplantes de órgãos e/ou tecidos a partir de doadores infectados, compartilhamento de equipamentos para uso de drogas, confecção de tatuagens e colocação de *piercing*, entre outros (FERREIRA E SILVEIRA et al., 2004; LAVANCHY, 2011).

1.2 VÍRUS DA HEPATITE C

O Vírus da Hepatite C foi identificado em 1989 por Choo e colaboradores como agente etiológico da doença, relatada anteriormente por Hepatite não-A não-B (NANB), que representava 90% das hepatites pós-transfusionais. A terminologia não-A não-B foi utilizada de 1975 até 1989, quando a denominação Hepatite C se estabeleceu diante da identificação do VHC (ALTER; HOUGHTON, 2000).

O VHC é um vírus envelopado, da família *Flaviviridae*, gênero *Hepacivirus* (MORADPOUR; PENIN; RICE, 2007), com 55 a 65 nm de diâmetro (CHOO et al., 1991). O genoma viral é constituído por uma molécula de RNA de fita simples, de polaridade positiva com aproximadamente 9.400 nucleotídeos (CHOO et al., 1991; SIMMONDS et al., 1993). O RNA viral, a partir de uma única região aberta de leitura, do inglês *open reading frame* (ORF), codifica uma poliproteína precursora de aproximadamente 3.011 resíduos de aminoácidos, a qual é clivada por proteases celulares e virais, originando várias proteínas estruturais e não estruturais envolvidas na replicação viral (Figura 1). Nas extremidades do genoma estão localizadas as regiões não traduzidas 5' e 3' (*untranslated region* - UTR) as quais incluem elementos necessários a tradução e replicação (LINDENBACH; RICE, 2005).

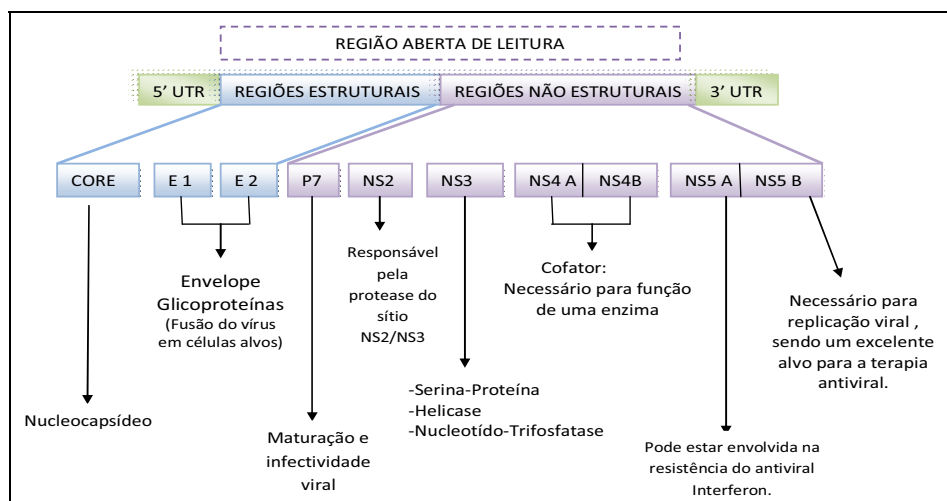


Figura 1: Esquema representativo do genoma do VHC, evidenciando os genes codificadores das proteínas estruturais e não estruturais e suas funções (Adaptado de LAUER; WALKER, 2001).

A região 5' UTR é altamente conservada com aproximadamente 341 nucleotídeos e desempenha um importante papel na replicação viral apresentando

uma importante região conhecida como IRES (*Internal Ribossomal Entry Site*) (KIEFT, 2008), essencial na tradução do genoma viral (LINDENBACH; RICE, 2005; SIMMONDS et al., 2005).

A região 3' UTR é formada por uma região variável de aproximadamente 80 nucleotídeos seguida de uma sequência de resíduos de uracila e uma região conservada de 98 nucleotídeos, importante na replicação viral (LINDENBACH; RICE, 2005).

As proteínas estruturais são representadas pela proteína C (proteína do core), pelas glicoproteínas do envelope (E1 e E2) (ZEIN, 2000) e por um pequeno peptídeo conhecido como p7 (GERMER; ZEIN, 2001). A proteína C é a segunda região mais conservada do genoma viral e constitui seu nucleocapsídeo (SIMMONDS et al., 1993; ZEIN, 2000), sendo codificada pelo gene do *core*. Já as glicoproteínas do envelope E1 e E2 possuem regiões hipervariáveis e são importantes no processo de ligação ao receptor celular e da fusão do envelope viral com a membrana da célula do hospedeiro (BARTOSH; DUBUISSON; COSSET, 2003; SIMMONDS et al., 1993; ZEIN, 2000) (Figura 2).

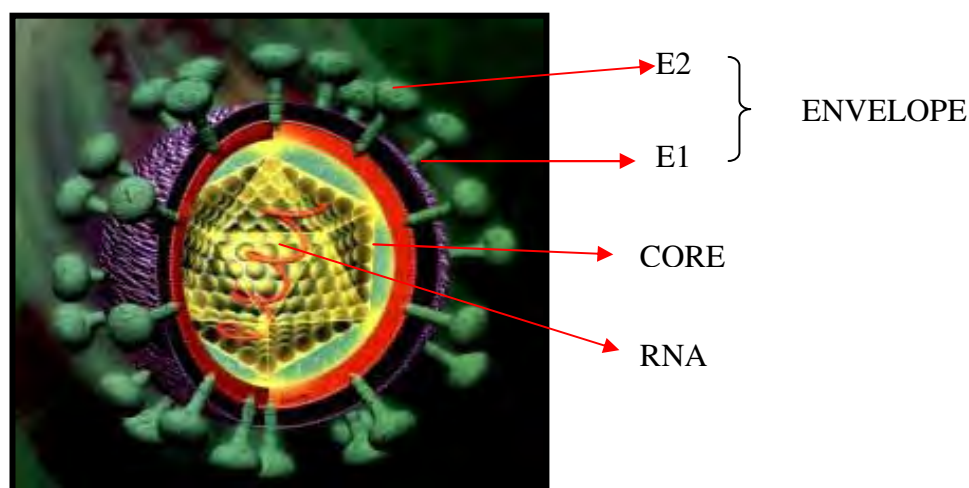


Figura 2: Representação esquemática do VHC, evidenciando o RNA viral, core e, as proteínas do envelope (E1 e E2) (Adaptado de Duke University Medical Center, 2011).

O peptídeo p7 é uma proteína hidrofóbica pequena composta por 63 aminoácidos, e provavelmente está envolvido na replicação do VHC (FLINT; MCKEATING, 2000; LANDFORD; BIGGER, 2002). Embora sua função, ainda, não

esteja totalmente esclarecida (LINDENBACH; RICE, 2005), é provável que funcione como um canal iônico na membrana celular (PAVILOVIC et al., 2003) tendo um papel importante na maturação e liberação do vírus (GRIFFIN et al., 2003).

As proteínas não estruturais NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A e NS5B (SIMMONDS et al., 2005) estão envolvidas na replicação viral, (GERMER; ZEIN, 2001), exercendo funções enzimáticas essenciais nesse processo (SUZUKI et al., 1999) (Figura 3).

A proteína NS2 aparece associada com a NS3 originando a autoprotease NS2/NS3, a qual pelo fato de ser a primeira a ser ativada é responsável pela maturação das outras proteínas NS (YAMAGA; OU, 2002; LINDENBACH; RICE, 2005).

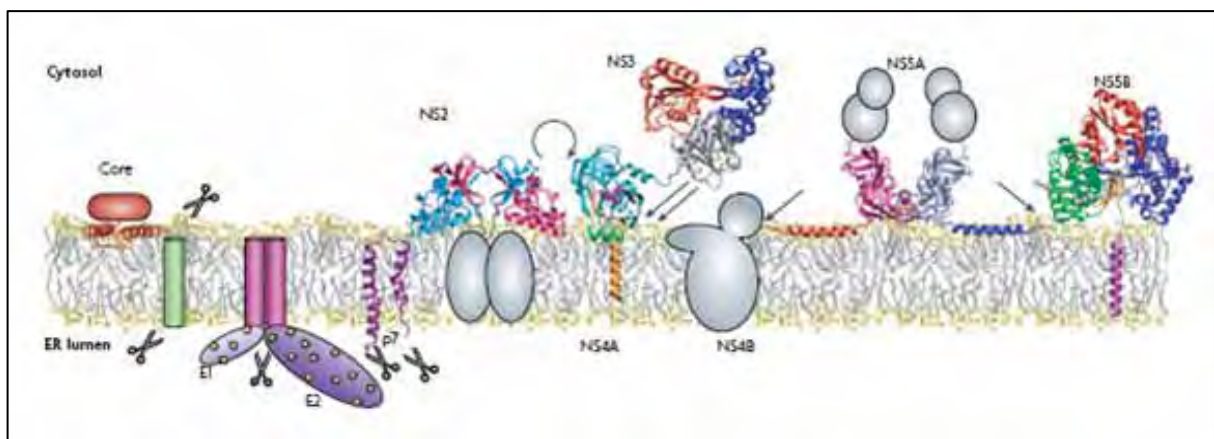


Figura 3: Proteínas do VHC e pontos de clivagem (Adaptado de MORADPOUR; PENIN; RICE, 2007).

A NS3 é uma proteína que realiza várias funções sendo responsável pela clivagem que ocorre na porção não estrutural da poliproteína precursora (ROINGEARD et al., 2004).

A NS4A funciona como um co-fator da proteína NS3, formando o complexo NS3/NS4A o qual é necessário para o processamento da poliproteína precursora (CLARKE, 1997; OKAMOTO; MIYAKAWA; MAYUMI, 1997; LINDENBACH; RICE, 2005). A região NS3/NS4A está sendo considerado um alvo para a terapia antiviral e, sua inibição poderia estar relacionada com o bloqueio da replicação do VHC (FRANCO; CLOTET; MARTINEZ, 2008).

Com relação ao polipeptídeo NS4B, sua função ainda não está bem caracterizada, sugerindo-se que ele promova a estabilidade das proteínas do vírus e do RNA durante a replicação (EINAV et al., 2004).

A proteína NS5A possivelmente desempenha funções no processo de replicação, exercendo um papel na modulação da resposta ao interferon (REED; GORBALENYA; RICE, 1998; ROINGEARD et al., 2004).

A proteína NS5B é uma RNA polimerase e é fundamental para a replicação do VHC (BEHRENS; TOMEI; FRANCESCO, 1996), sendo considerado um dos alvos para terapias antivirais (MORADPOUR; PENIN; RICE, 2007).

1.3 DIVERSIDADE GENÉTICA DO VHC

Análises filogenéticas do genoma viral utilizando sequências nucleotídicas das variantes virais circulantes distinguiram vários genótipos e subtipos virais. Atualmente, utiliza-se a classificação baseada em seis genótipos designados pelos números de 1 a 6, os quais divergem em aproximadamente 25 a 35% nas sequências de nucleotídeos e, um grande número de subgrupos denominados subtipos, designados por letras do alfabeto, divergindo entre si em 15 a 20% de suas sequências de nucleotídeos (Figura 4) (SIMMONDS, 1994; ROBERTSON et al., 1998). Recentemente um novo genótipo foi descrito sendo designado genótipo 7 (KUIKEN; SIMMONDS, 2005; GOTTWEIN et al., 2009). Vírus de mesmo genótipo e subtipo podem, ainda, apresentar variações de sequências nucleotídicas circulantes em um mesmo indivíduo, as quais são denominadas *quasispecies*, o que ocorre devido à imperfeita replicação do vírus e constantes mutações (STRAUSS, 2001; SHARMA, 2010). Essas podem estar presentes no início da infecção ou originar-se durante a progressão da doença como consequência de mecanismos de adaptação e escape as defesas do organismo (HONDA et al., 1994; NAITO; HAYASHI; KAMADA, 1995).

Os genótipos 1, 2 e 3 são distribuídos mundialmente (SIMMONDS et al., 2005), o genótipo 4 é prevalente no Oriente Médio e norte da África, o 5 é comum na África do Sul e o 6 na Ásia (ZEIN, 2000). No Brasil, o genótipo 1 é o mais freqüentemente encontrado, seguido dos genótipos 3 e 2, respectivamente (CAMPIOTTO et al., 2005; MARTINS et al., 2006).

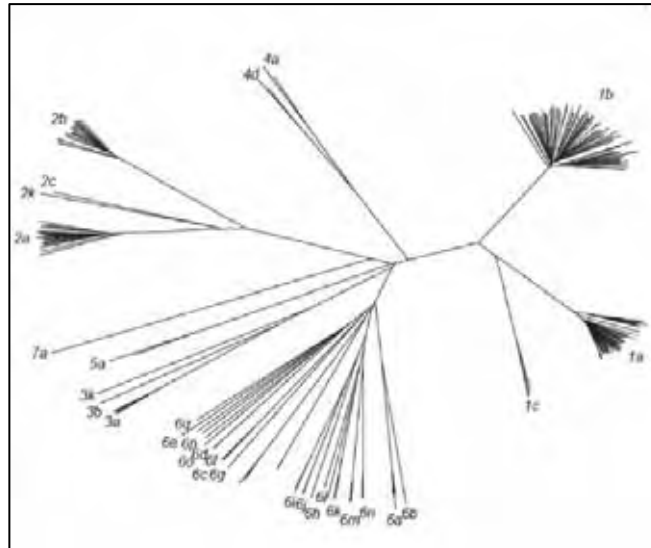


Figura 4: Árvore filogenética representando os genótipos (representados por algarismos arábicos) e subtipos (representados por letras do alfabeto), de acordo com a sequência do genoma completo do VHC (Adaptado de CHAYAMA; HAYES, 2011).

1.4 TROPISMO VIRAL E CICLO REPLICATIVO

Independente do genótipo, o VHC apresenta tropismo pelo tecido hepático, local no qual o genoma viral conduz a síntese de proteínas virais e assim, produz novos vírus. O ciclo replicativo do vírus tem início com a interação das glicoproteínas do envelope viral, E1 e E2 com um receptor na superfície celular, o CD81, uma tetraspanina, encontrada na membrana celular de alguns tipos celulares, inclusive em hepatócitos (FLINT; QUINN, LEVY, 2001). Após esta interação, ocorre a fusão do envelope viral e membrana da célula hospedeira, liberando o RNA viral no interior da célula. O RNA viral internalizado (fita positiva) funciona como molde para a

síntese de uma fita de RNA intermediária (fita negativa), esta será utilizada para a síntese de várias outras fitas de RNA. As fitas positivas podem sofrer tradução ou constituir o genoma dos novos vírus que serão formados. A síntese protéica ocorre pela síntese de uma única poliproteína viral, a qual é posteriormente clivada em proteínas estruturais e não estruturais. As proteínas e moléculas de RNA sintetizadas são encapsuladas e novos vírus são liberados por exocitose (BARTENSCHLAGER; LOHMANN, 2000; LINDENBACH; RICE, 2005; BURLONE; BUDKOWSKA, 2009).

Apesar da forma de entrada do VHC nas células alvo não estar bem elucidada pelo fato, de não existir modelo experimental, várias moléculas de superfície celular são consideradas receptores ou co-receptores fundamentais para a entrada do VHC nas células. Foram identificadas as principais moléculas envolvidas na entrada do VHC: a tetraspanina CD81 (PILERI et al., 1998), a claudulina-1 (CLDN-1) (EVANS et al., 2007), o receptor *scavenger* tipo B classe I (SR-BI/Cla1) (SCARSELLI et al., 2002) e algumas glicosaminoglicanas também vêm sendo associadas à adesão e entrada do VHC nos hepatócitos (AGNELLO et al., 1999; CORMIER et al., 2004). Desta forma, fica clara a participação de proteínas de adesão celular na entrada do VHC, porém os mecanismos exatos de entrada do vírus nas células permanecem desconhecidos (BURLONE; BUDKOWSKA, 2009).

Embora o hepatócito seja a principal célula alvo do VHC, o RNA viral já foi encontrado em linfócitos (PAVIO; LAI, 2003), monócitos, macrófagos (MULLER et al., 1995), células dendríticas (NAVAS et al., 2002), células do epitélio intestinal e sistema nervoso central (FLINT; QUINN, LEVY, 2001). Além disso, estudos já demonstraram que indivíduos infectados pelo VHC apresentam RNA viral associado a plaquetas sendo estas carreadoras do vírus na circulação (HAMAIA; LI, ALLAIN, 2001).

1.5 TRATAMENTO ANTIVIRAL

Embora o vírus possa estar circulante em um indivíduo infectado, o principal objetivo do tratamento antiviral é controlar a progressão da doença hepática por meio da inibição da replicação viral. De forma geral, a redução da atividade inflamatória impede a evolução para cirrose (REDDY et al., 2001). O tratamento antiviral tem como objetivo a obtenção de uma resposta virológica sustentada (RVS) evidenciada por viremias inferiores a 50UI/mL no plasma ou soro do paciente, ditas indetectáveis, por seis meses após o término da terapia (KEMMER et al., 2007).

Vários esquemas terapêuticos têm sido propostos e avaliados para o tratamento da Hepatite C crônica (POYNARD et al., 2002). A terapia inicialmente utilizada para a forma crônica da doença foi o Interferon alfa recombinante (IFN- α) com eficácia limitada. A associação com a Ribavirina (RBV) elevou os índices de sucesso da terapêutica, embora muitos pacientes ainda mantiveram-se como não respondedores ao tratamento (DAVIS; LAU, 1997; ALMEIDA, 2010). Diferentes formas de interferon foram sendo desenvolvidas ao longo dos anos e, a introdução do Interferon-alfa peguilado (PEG-INF) ainda associado com o análogo nucleosídico Ribavirina elevou os índices de RVS (SELZNER et al., 2008; SHARMA, 2010).

O tratamento para a infecção pelo VHC no Brasil segue a Portaria 221/SVS/MS, na qual o tratamento da Hepatite C está indicado para pacientes portadores crônicos do VHC confirmado por técnicas de biologia molecular, com fibrose e atividade necro-inflamatória de moderadas a intensas reveladas por biópsia hepática. A portaria preconiza, ainda, tratamento diferencial na dependência do genótipo viral: portadores de vírus de genótipo 1, virgens de tratamento devem receber a combinação Interferon peguilado e Ribavirina por até 48 semanas, enquanto que pacientes infectados por outros genótipos (2 ou 3) do VHC serão tratados com Interferon convencional associado à Ribavirina por 24 semana (BRASIL, 2011). No caso da existência de fatores preditores de baixa resposta ao tratamento com o interferon convencional como, manifestações de cirrose hepática e

carga viral superior a 600.000UI/mL, os pacientes podem ser tratados com interferon peguilado associado a ribavirina com duração de 24 a 48 semanas.

Embora raro no Brasil, portadores do VHC de genótipo 4 devem receber a mesma combinação terapêutica recomendada para pacientes com vírus de genótipo 1 (DUNCAN et al., 2003). Portanto, a Ribavirina (RBV) sempre deve ser associada ao IFN convencional ou PEG-IFN. A monoterapia com RBV não confere ação antiviral no tratamento da Hepatite C (BRASIL, 2011).

Os avanços da terapia antiviral ainda envolveram o desenvolvimento de antivirais de ação direta na atividade replicativa do vírus, que representam potenciais alvos farmacológicos. Dois novos medicamentos que atuam inibindo a enzima protease do VHC, Boceprevir (BOC) e Telaprevir (TVR) estão sendo utilizados atualmente para o tratamento de pacientes, os quais não responderam ao esquema terapêutico convencional (GHANY et al., 2011; BRASIL, 2012).

Na ausência de contraindicações ao uso de Inibidores da Protease, sua introdução para o retratamento está recomendado para pacientes mono infectados pelo VHC, portadores de genótipo 1, com fibrose hepática avançada (F3 ou F4) com evidências por métodos de imagem ou endoscópicas de cirrose, portadores de doença hepática compensada, para pacientes recidivantes e que obtiveram resposta parcial ou nulos de resposta ao tratamento com Interferon peguilado e Ribavirina e em pacientes que não realizaram tratamento prévio com Inibidores da Protease (GHANY et al., 2011; BRASIL, 2012).

De forma geral, as indicações para estes medicamentos são:

1- Uso de Telaprevir para pacientes cirróticos, definido por biópsia hepática com classificação histológica F4 que estejam em retratamento ou em seu primeiro tratamento não atingindo resposta virológica completa na semana 4 e/ou 12 e para pacientes nulos de resposta ao tratamento convencional quer sejam F3 ou F4 (BRASIL, 2012);

2- Uso de Boceprevir como alternativa nas situações descritas no item 1 em caso de intolerância ao Telaprevir que exija sua interrupção (BRASIL, 2012);

3- O uso de Boceprevir ou Telaprevir em pacientes F3 em retratamento ou em seu primeiro tratamento quando não atingem resposta virológica completa na semana 4 e/ou 12 (BRASIL, 2012).

No Brasil, a portaria 221/SVS/MS define alguns critérios para classificação da resposta ao tratamento, definidas da seguinte forma, sendo o limite de detecção da técnica variando entre 12UI/mL a 50UI/mL na dependência da metodologia empregada.

Resposta virológica rápida (RVR), definida como RNA do VHC inferior ao limite de detecção da técnica na 4^a semana de tratamento;

Resposta virológica precoce (RVP), definida como redução de, no mínimo, duas escalas logarítmicas (2 Log) ou 100 vezes o valor do RNA do VHC quantificado pré-tratamento (RVP parcial), ou sua indetecção na 12^a semana de tratamento (RVP total);

Resposta virológica ao final do tratamento (RVF), definida como RNA do VHC inferior ao limite de detecção da técnica ao final do tratamento;

Resposta virológica sustentada (RVS), definida como RNA do VHC inferior ao limite de detecção da técnica na 24^a semana de seguimento; após o término do tratamento;

Recidiva virológica (recidivantes), definida como RNA do VHC inferior ao limite de detecção da técnica ao final do tratamento e, detectável 24 semanas após o término do tratamento;

Respondedor lento, definido como o paciente que apresenta RVP parcial (RNA do VHC detectável, porém com queda superior a 2 Log na semana 12) e indetectável na 24^a semana (6 meses) de tratamento;

Não respondedor parcial, definido como o paciente que apresenta RVP parcial (RNA do VHC detectável, porém com queda superior a 2 Log na semana 12) e detectável na 24^a semana de tratamento;

Nulo de resposta, definido como o indivíduo que não apresenta pelo menos RVP parcial (queda de pelo menos 2 Log do valor do RNA do VHC pré tratamento, na 12^a semana de tratamento).

Apesar dos grandes avanços com relação à terapêutica antiviral na infecção pelo VHC, alguns pacientes não atingem níveis de RNA viral indetectáveis no soro depois da terapia, os quais são ditos não respondedores. Da mesma forma, alguns pacientes podem apresentar uma supressão inicial da viremia, a qual, no entanto, volta a ser detectável depois de seis meses depois do término da terapia, caracterizando um grupo de pacientes em recidiva (MCHUTCHISON et al., 1998; KEMMER et al., 2007; GHANY et al., 2011).

Aproximadamente um terço dos pacientes infectados com o VHC de genótipo 1 e que fizeram realizaram o esquema terapêutico preconizado para estes casos apresentam uma recidiva virológica. Embora os índices de recidiva sejam elevados, seus mecanismos ainda não são bem compreendidos (GHANY et al., 2009; POORDAD; FLAMM, 2009).

Pacientes recidivantes tratados com IFN convencional podem ser tratados novamente com Interferon peguilado e Ribavirina devendo completar a associação até a 48^a semana (JACOBSON et al., 2005; MATTHEW et al., 2006; CHERUVATTATH et al., 2007; POYNARD et al., 2009), no entanto o retratamento está associado a menores índices de resposta (inferior a 20% dos casos) (YOSHIDA et al., 2009). Os maiores índices de RVS no retratamento entre os infectados pelos genótipos não-1 do VHC que haviam utilizado IFN convencional está associado a baixas cargas virais e fibrose mais leve (KRAWITT et al., 2005; MATTHEW et al., 2006; PARISE et al., 2006; TALIANI et al., 2006; SHERMAN et al., 2006; EVERSON et al., 2006). Ainda existem poucas evidências científicas sobre o retratamento para pacientes tratados com PEG-IFN associado a RBV e, a maioria dos estudos apresenta casuística pequena e resultados heterogêneos quanto à obtenção de RVS (CORNBURG et al., 2006; YOSHIDA et al., 2009). Nestes casos, para pacientes recidivantes o retratamento recomendado é a associação de PEG-IFN com RBV (BRASIL, 2011).

Desta forma, apesar dos avanços no tratamento antiviral, a eficácia dos medicamentos em recidivantes continua limitada (CHERUVATTATH et al., 2007; POYNARD et al., 2009).

Neste cenário, a avaliação da resposta ao tratamento na infecção crônica pelo VHC vem sendo realizada por tecnologias baseadas em ácidos nucleicos, as quais podem ser qualitativas ou quantitativas. Os testes qualitativos são úteis para detectar uma resposta virológica sustentada, a qual constitui um benefício em longo prazo (LAU et al., 1998). Já os testes quantitativos (carga viral) vêm sendo utilizados com função prognóstica (ICHIJO et al., 1997; CHARLTON et al., 1998; BERENQUER et al., 1999) na avaliação de novos esquemas terapêuticos, modificações de terapia (BONETTI et al., 1997) e seguimento de tratamento. Além disso, a carga viral realizada em momento anterior ao início do tratamento, quando associada a outros parâmetros como genótipo, sexo, idade e extensão da fibrose, pode contribuir para decisão clínica quanto ao esquema terapêutico a ser utilizado (POYNARD et al., 2000).

Atualmente o monitoramento terapêutico vem sendo realizado no plasma ou soro conforme preconizado nas portarias ministeriais, refletindo as taxas de replicação viral a fim de constituir um importante parâmetro laboratorial para avaliar a necessidade de introdução da terapêutica e, acompanhamento da mesma (BRANDÃO et al., 2001; PAWLOTSKY, 2002; CHARY et al., 2012). No Brasil, a portaria 221/SVS/MS preconiza a realização dos testes quantitativos de detecção do RNA viral (carga viral) em momentos pré-determinados no tratamento com Interferon Peguilado e RBV. O primeiro teste deve ser realizado pré-tratamento para avaliar a necessidade de introduzir a terapia. O acompanhamento pelo teste quantitativo deve ser realizado na 12^a, 24^a e 48^a semana depois de introduzida a terapêutica com o objetivo de avaliar a resposta terapêutica. Esse também deve ser realizado, ainda, seis meses após o término da terapia (semana 24 depois do término do tratamento) para avaliar a resposta terapêutica final. Assim, com a nova portaria o teste qualitativo, anteriormente utilizado para avaliar resposta terapêutica, foi substituído pelas metodologias quantitativas (BRASIL, 2011).

1.6 CINÉTICA VIRAL E COMPARTIMENTOS BIOLÓGICOS DO VHC

O estudo da cinética viral na infecção pelo VHC ainda oferece dificuldades devido à ausência de modelos experimentais eficientes de cultura (PENIN et al., 2004). Modelos de replicação do VHC utilizando ferramentas de engenharia genética demonstraram que mutações adaptativas ocorrem freqüentemente em diferentes variantes virais e, podem favorecer a replicação do vírus. Estas mutações não ocorrem nos tipos selvagens e podem levar a conclusões errôneas sobre a dinâmica viral ou atividade de antivirais (BARTOSH E COSSET, 2006).

Assim, a patogênese da infecção pelo VHC difere dos modelos clássicos de infecção por vírus, reflexo da adaptação ao ser humano. Depois da infecção pelo vírus, durante a fase aguda, alguns mecanismos de escape do sistema imunológico do hospedeiro foram descritos, como a supressão de antígenos virais sobre a resposta inata e adaptativa, a influência de altas cargas virais no início da infecção e a presença das *quasispecies*, o que dificulta o reconhecimento do vírus pelos linfócitos B e T (NEUMANN-HAEFELIN et al., 2005; ALTER 2006).

No decurso da infecção crônica pelo vírus, fases de alto nível de viremia podem alternar com as fases de baixo nível de viremia ou indetecção do vírus no plasma ou soro (FUJIWARA et al., 2012). No entanto, não é somente no plasma e/ou soro que o VHC vem sendo encontrado nos pacientes infectados. Estudos têm revelado a detecção do RNA viral em outros compartimentos (CASTILHO et al., 2005). Estudos já relataram a presença do RNA viral em compartimentos extra-hepáticos como sangue total e células mononucleares do sangue periférico, embora a significância destes achados na resposta à terapêutica não tenha sido bem esclarecida ainda (SCHMIDT et al., 1997, CHARY et al., 2012).

Da mesma forma, o RNA viral já foi associado às plaquetas, as quais são carreadoras do vírus na circulação (TRIMOULET et al., 2000; DE ALMEIDA et al., 2009), no entanto, o mecanismo de interação do vírus a estes fragmentos citoplasmáticos ainda não é bem compreendido (DE ALMEIDA et al., 2007).

Poucos estudos têm sido realizados na tentativa de avaliar a quantificação do RNA viral em outros compartimentos biológicos e a significância deste achado no resultado da terapia antiviral (CHARY et al., 2012), de forma que ainda não é bem estabelecido se o nível de RNA do VHC em outros compartimentos biológicos apresenta níveis distintos no plasma ou soro.

Neste cenário, considerando que o VHC é carregado pelas plaquetas na circulação, a avaliação quantitativa do RNA viral neste compartimento biológico pode se mostrar relevante para algumas situações clínicas.

2 OBJETIVOS

Avaliação comparativa *in vitro* do RNA do VHC plasmático e do RNA do VHC carregado à plaqueta.

Avaliação comparativa da quantificação do RNA viral do VHC em plasma e plaquetas de pacientes com recidiva ao tratamento antiviral.

3 CASUÍSTICA E MÉTODOS

3.1 CASUÍSTICA

No presente estudo foram utilizadas amostras de sangue periférico provenientes de pacientes infectados pelo VHC atendidos na Divisão de Gastroenterologia, Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, UNESP, Botucatu, SP, Brasil.

Os dados laboratoriais foram obtidos no Laboratório de Biologia Molecular do Hemocentro da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP.

Os critérios de inclusão utilizados nesse estudo foram: presença do RNA-VHC confirmada por técnicas de biologia molecular, assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido. Os critérios de exclusão foram: pacientes com sorologia positiva para o Vírus da Hepatite B (VHB) ou Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV).

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP mediante ofício de número 3764-2011.

3.2 DELINEAMENTO DOS EXPERIMENTOS E METODOLOGIA

a) Análise quantitativa e curva de degradação do RNA do VHC plasmático e plaquetário (estudo *in vitro*)

O experimento foi repetido em triplicata, a partir de sangue total de pacientes virgens de tratamento, com níveis de RNA plasmático entre 5,64 a 6,90 Log.

Todas as amostras foram coletadas por profissional devidamente habilitado para esta função, em tubo do tipo *vacutainer*® (*Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA*) com 1,5mg/mL do anticoagulante ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), num volume de dois tubos de 5 mL.

Depois da coleta, as amostras foram imediatamente processadas no Laboratório de Biologia Molecular, Hemocentro de Botucatu, Faculdade de Medicina, Unesp. Este processamento envolveu a centrifugação por 3 minutos a 1312xg para separação de quatro alíquotas de plasma de cada uma das amostras, as quais foram processadas separadamente segundo procedimento descrito abaixo:

1-Primeira Alíquota (A1): a primeira alíquota de plasma foi processada imediatamente, depois da separação, para obtenção das plaquetas segundo protocolo padronizado no Laboratório de Componentes Lábeis do Hemocentro de Botucatu, o qual consiste na centrifugação do plasma a 1600xg por 5 minutos, retirada do plasma (o qual foi armazenado para posterior utilização) e, lavagem do *pellet* de plaquetas obtido por quatro vezes com 1 mL de salina fisiológica. Depois deste procedimento plasma e *pellet* de plaquetas foram armazenados em -70°C até a quantificação do RNA viral.

2-Segunda Alíquota (A2): a segunda alíquota de plasma foi incubada à 37°C no *Incubator Shaker (New Brunswick Scientific, USA)* por 48h sob homogeneização horizontal à 30xg. Decorrido este período a alíquota foi processada de forma idêntica a descrita no item 1 e, plasma e *pellet* de plaquetas armazenados a -70°C.

3-Terceira Alíquota (A3): a terceira alíquota foi incubada à 37°C no *Incubator Shaker (New Brunswick Scientific, USA)* por 96h sob homogeneização horizontal à 30xg. Decorrido este período a alíquota foi processada de forma idêntica a descrita no item 1 e, plasma e *pellet* de plaquetas armazenados a -70°C.

4-Quarta Alíquota (A4): a quarta alíquota foi incubada à 37°C no *Incubator Shaker (New Brunswick Scientific, USA)* por 144h sob homogeneização horizontal à 30xg. Decorrido este período a alíquota foi processada de forma idêntica a descrita no item 1 e, plasma e *pellet* de plaquetas armazenados a -70°C.

Todas as alíquotas de plasma foram processadas para extração do RNA viral utilizando o *QIAamp Viral RNA mini kit (QIAGEN, Valencia, CA, EUA)*, segundo especificações do fabricante. Para extração do RNA viral do *pellet* de plaquetas uma etapa inicial de lise com o *RLT Buffer (QIAGEN, Valencia, CA, EUA)* precedeu a extração com o kit supracitado.

O RNA extraído foi utilizado para as análises por PCR em Tempo Real (qPCR) utilizando o *One Step RT-PCR kit (Promega Corporation, Madison, WI, USA)*, segundo especificações do fabricante. Os *primers* e sondas foram dirigidos contra a região 3'UTR do VHC (DREXLER et al., 2009). A detecção foi realizada em um sistema de dupla hibridização utilizando uma sonda com o repórter fluorescente

6-carboxi- 4 ,7, 2', 7'-tetracloro-fluoresceína (VIC), que hibridiza especificamente no VHC alvo e, uma sonda com o repórter fluorescente 6-carboxifluoresceína (FAM), o qual anela especificamente no vírus calibrador. A reação foi realizada no equipamento ABI 7500 (*Applied Biosystems*) sob as condições de ciclagem 48°C por 30 minutos, 95°C por 15 minutos e 50 ciclos de 94°C por 10 segundos, 58°C por 33 segundos.

O RNA do VHC foi quantificado utilizando uma curva padrão obtida com a utilização de três padrões (3.000, 30.000, 300.000), os quais foram amplificados, em poços separados, com os mesmos *primers* e sondas utilizadas para o vírus alvo. A quantificação absoluta do RNA do VHC foi realizada mediante leitura das fluorescências emitidas no equipamento ABI 7500 (*Applied Biosystems*), segundo especificações do fabricante e, comparação das mesmas com a curva padrão gerada no equipamento.

A análise dos resultados dessa fase do estudo foi realizada de forma descritiva.

b) Avaliação comparativa da quantificação do RNA viral do VHC em plasma e plaquetas de pacientes com recidiva ao tratamento antiviral (estudo *in vivo*)

Para esta avaliação foram acompanhados pacientes que iniciaram o tratamento antiviral a partir de janeiro de 2011, época do início do estudo. O acompanhamento prosseguiu até julho de 2012.

Os critérios de inclusão para esta fase do estudo além dos já estabelecidos na seção casuística deste exemplar, ainda incluíam a coleta de amostras de sangue total regularmente ao longo do tratamento nas semanas preconizadas pela portaria 221/SVS/MS, ou seja, nas semanas 0, 12, 24, 48 depois do início do tratamento além das semanas 12 e 24 depois do término da terapia.

Desta forma, no período do estudo, puderam ser acompanhados 230 pacientes que obedeciam aos critérios de inclusão, dos quais foram selecionados aqueles que finalizaram o tratamento até julho de 2012 e, dentre estes, os que apresentaram recidiva virológica ao tratamento antiviral estabelecido. Recidiva virológica foi definida como presença de RNA detectável na 24^a semana depois de 48 semanas de tratamento.

Dos pacientes em recidiva virológica foram processadas amostras de sangue total em dois momentos: no momento da recidiva virológica e, no momento imediatamente anterior (12 semanas anteriores à recidiva). Estas amostras foram processadas para separação do plasma e *pellet* de plaquetas de forma idêntica a descrita no item a.

A extração de RNA e Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (qPCR) também foram desempenhadas da mesma forma à anteriormente descrita.

Análise estatística pelo método *Least Squares Means* (SHUN et al., 2003) foi conduzida para comparar os resultados da quantificação do RNA do VHC no plasma e plaquetas nos pacientes em recidiva virológica.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A quantificação do RNA do VHC (carga viral) é considerada o marcador laboratorial mais adequado tanto para o estabelecimento do prognóstico de indivíduos infectados quanto para monitorar a resposta terapêutica e para a avaliação da progressão da doença (BRANDÃO et al., 2001; PAWLOTSKY, 2002). Quando se considera a relevância clínica do exame, a quantificação do RNA viral é realizada utilizando o plasma ou soro dos pacientes infectados, uma vez que o RNA presente no plasma representa a dinâmica da infecção, quantificando os vírus que estão sendo produzidos e lançados na circulação no momento da coleta do exame (SIEMENS, 2007).

Embora o VHC seja prevalentemente hepatotrópico, estudos demonstram a existência de replicação viral em sítios extra-hepáticos demonstrando o tropismo do vírus por outras células (HAMAIA; LI, ALLAIN, 2001; DE ALMEIDA et al., 2010). A detecção do RNA viral tem sido documentada em diferentes subpopulações de células mononucleares do sangue, incluindo os linfócitos B e T (PAVIO; LAI, 2003), monócitos e macrófagos (MULLER et al., 1995), células dendríticas (NAVAS et al., 2002), células do epitélio intestinal e sistema nervoso central (FLINT; QUINN, LEVY, 2001). Além disso, estudos já demonstraram que indivíduos infectados pelo VHC apresentam RNA viral associado às plaquetas, sendo essas carreadoras do vírus na circulação (PUGLIESE et al., 2004), podendo também ter características de reservatório natural (ALTER, 2001; HAMAIA; LI, ALLAIN, 2001; BLACKARD et al., 2007; DE ALMEIDA et al., 2009; FARIAS et al., 2010).

Nesta linha de raciocínio, as plaquetas podem funcionar como importante compartimento para o vírus e, sequestrar vírions da circulação, contribuindo para a persistência viral e escape viral do sistema imunológico do hospedeiro (ALTER, 2001).

Este estudo avaliou *in vitro* os níveis de RNA do VHC no plasma e carreado à plaquetas. Os resultados demonstraram que nas triplicatas realizadas o nível de RNA viral no plasma na amostra processada logo após a coleta (A1) foi superior ao observado nas plaquetas (Figuras 5, 6 e 7). No entanto, com o passar do tempo (depois de 48, 96 e 144 horas de incubação) os níveis de RNA viral plasmático em todas as repetições do ensaio foram declinando, sugerindo uma degradação progressiva do RNA do VHC plasmático. De forma contrária ao observado no plasma, os níveis de RNA plaquetários se mantiveram estáveis ao longo do tempo (Figuras 5, 6 e 7), sugerindo que o vírus carreado à plaqueta parece se preservar por mais tempo quando comparado ao livre no plasma.

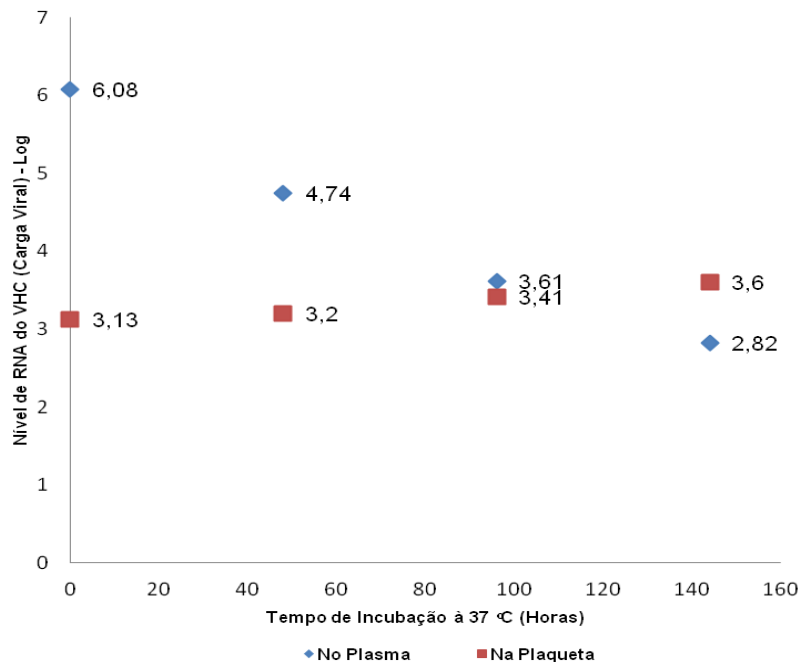


Figura 5: Níveis de RNA do VHC no plasma (azul) e associado à plaquetas (vermelho) para a primeira amostra determinados ao longo do tempo: em 0 (no momento da coleta) e depois de 48, 96, 144 horas de incubação à 37°C.

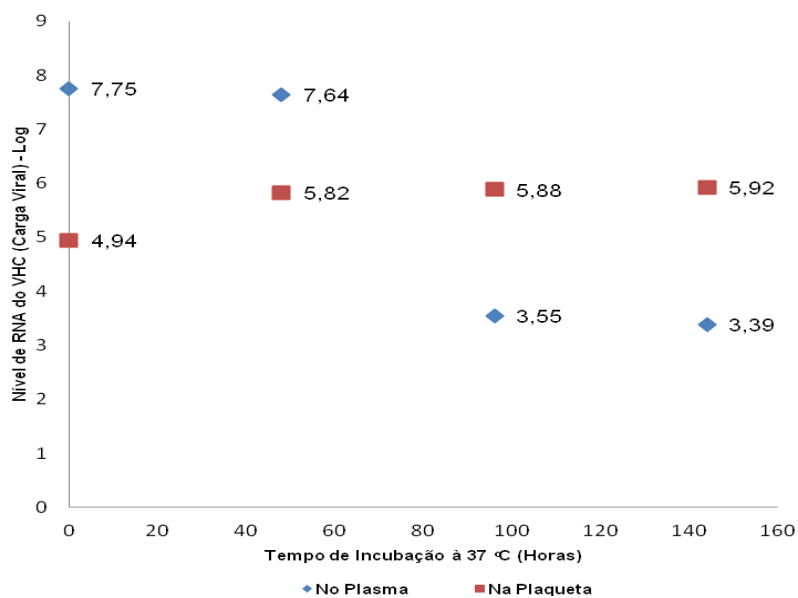


Figura 6: Níveis de RNA do VHC no plasma (azul) e associado à plaquetas (vermelho) para a amostra 2 determinados ao longo do tempo: em 0 (no momento da coleta) e depois de 48, 96, 144 horas de incubação à 37°C.

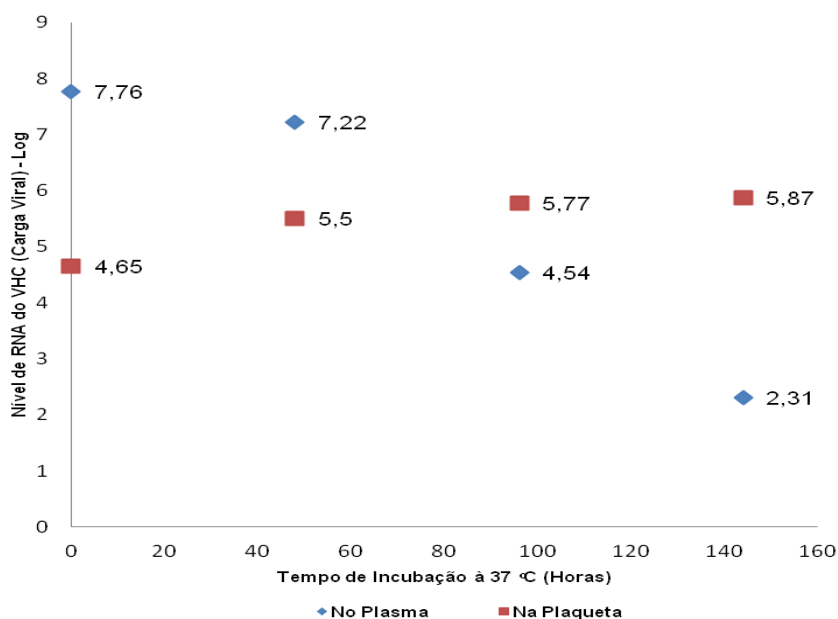


Figura 7: Níveis de RNA do VHC no plasma (azul) e associado à plaquetas (vermelho) para a amostra 3 determinados ao longo do tempo: em 0 (no momento da coleta) e depois de 48, 96, 144 horas de incubação à 37^oC.

Já é bem documentada na literatura científica a baixa estabilidade do RNA do VHC (LEE et al., 2002), as quais podem ser rapidamente degradadas por endonucleases específicas e inespecíficas caso a amostra não seja estabilizada em um curto período de tempo após a coleta (LEE et al., 2002). Na rotina laboratorial várias estratégias para estabilização do RNA nas amostras vêm sendo propostas como a utilização de tubos de coleta com soluções estabilizadoras de RNA (FAN; HEGDE, 2005). Assim, o declínio dos níveis de RNA viral plasmático observado ao longo do tempo neste estudo poderia ser explicado pela ação destas enzimas presentes na amostra que degradariam rapidamente o RNA do VHC.

Alguns estudos anteriores postularam que a detecção do RNA do VHC nas plaquetas poderia advir de adsorção não específica das partículas virais circulantes às plaquetas. Além disso, já foi demonstrado que partículas de VHC livres e complexadas com IgG se associam proporcionalmente e eficientemente à plaquetas (HIJIKATA et al., 1993; HAMAIA et al., 2001). Dessa forma, os resultados aqui obtidos, os quais demonstram uma maior preservação dos níveis de RNA viral nas

plaquetas quando comparados ao plasma, poderiam ser explicados pelo fato de que a ligação do vírus com IgG na superfície plaquetária poderia proteger estas partículas da ação das endonucleases específicas e inespecíficas.

Os resultados obtidos nesta etapa do estudo sugerem que a plaqueta funciona como um compartimento biológico distinto do plasma na infecção pelo VHC.

A terapia antiviral visa controlar a progressão da doença hepática por meio da inibição da replicação viral (REDDY et al., 2001; FOCACCIA et al., 2002) e, a obtenção de uma resposta virológica sustentada (RVS) evidenciada por viremias indetectáveis no plasma ou soro por seis meses após o término da terapia (KEMMER et al., 2007). No entanto, apesar dos grandes avanços obtidos na terapêutica, muitos pacientes são não respondedores ou recidivantes a terapia instituída (MCHUTCHISON et al., 1998; KEMMER et al., 2007; FILIPOWICZ, 2010).

No período deste estudo, de janeiro de 2011 a julho de 2012 foram acompanhados 230 pacientes que obedeciam aos critérios de inclusão, dos quais 30 finalizaram o tratamento até julho de 2012. Destes 30 pacientes que iniciaram e finalizaram o tratamento dentro do período do estudo, somente cinco (16,67%) foram caracterizados como recidivantes à terapêutica antiviral.

No decurso da infecção crônica pelo VHC, fases de alto e baixo nível de viremia podem se alternar. Esses achados têm sido atribuídos, pela detecção do VHC em outros compartimentos biológicos (TRIMOULET et al., 2000; DE ALMEIDA et al., 2009).

Estudos já demonstraram a presença do RNA viral do VHC em compartimentos extra-hepáticos, embora sua influência na terapia antiviral ainda seja controversa (HAMAIA; LI, ALLAIN, 2001).

Os resultados desta fase do estudo demonstraram que na 12^a semana depois de finalizado o tratamento os níveis de RNA viral no plasma e plaqueta permaneciam indetectáveis (inferior a 18,4 UI/mL) (dado não mostrado), embora na 24^a semana pós término da terapia os níveis de RNA viral foram detectáveis em ambos os compartimentos biológicos (Figura 8). Estes resultados demonstraram que

os níveis de RNA viral não se mostraram detectáveis na plaqueta em momento anterior ao plasma (semana 12 após o término da terapêutica), sugerindo que este compartimento biológico não poderia ser utilizado como marcador de recidiva precoce.

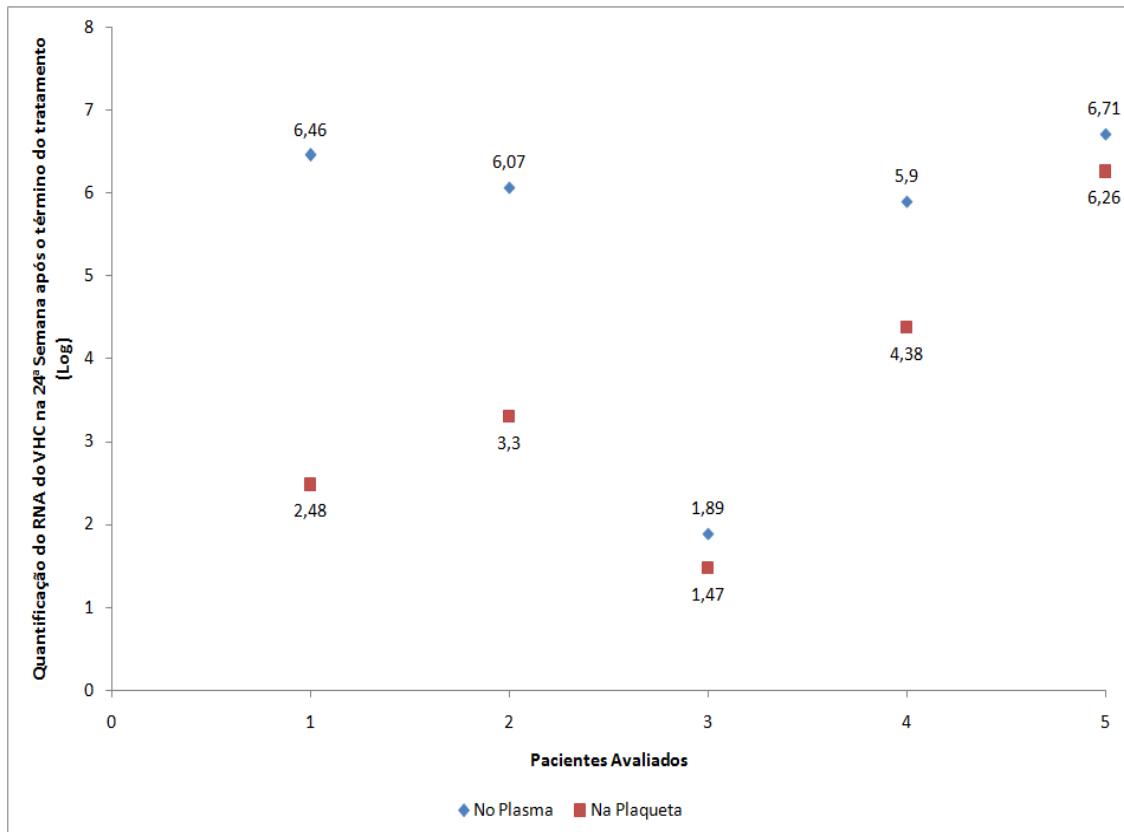


Figura 8: Níveis de RNA do VHC no plasma (azul) e associado à plaquetas (vermelho) na 24ª semana depois do término da terapia antiviral para os cinco pacientes em recidiva virológica.

Embora tenha sido encontrado um pequeno número de pacientes em recidiva virológica durante o período do estudo, a comparação das médias das cargas virais no plasma e na plaqueta destes pacientes na 24ª semana depois do término do tratamento demonstrou diferença significativa ($p=0,03$) utilizando o método de *Least Squares Means* (SHUN et al., 2003).

Estudos que realizam análises comparativas da quantificação do RNA viral em amostras biológicas vêm considerando que diferenças inferiores a 0,3

(GINOCCHIO et al., 1997) ou 0,5 log (BALERIOLA et al., 2011) não apresentam significado clínico relevante para o acompanhamento da eficiência terapêutica, sendo consideradas equivalentes (GINOCCHIO et al., 1997; BALERIOLA et al., 2011).

Ao analisar individualmente cada paciente avaliado os resultados demonstram que para três deles (pacientes 1, 2 e 4) houve uma diferença superior a 0,5 log entre os níveis de RNA viral no plasma e plaqueta, sendo que na plaqueta estes níveis são inferiores ao detectado no plasma. Para os dois outros pacientes (3 e 5) esta diferença ficou próxima a 0,4 log.

Dessa forma, as plaquetas podem ter uma importante função na disseminação do VHC contribuindo para a persistência do vírus no organismo de um paciente infectado (ALTER, 2001).

Considerando estas hipóteses os resultados obtidos nesta fase do estudo sugerem que embora as plaquetas não constituam um marcador de recidiva precoce, elas podem contribuir para a disseminação do vírus pelo organismo do paciente depois da recidiva virológica e, transportar estes vírus para outros compartimentos biológicos.

5 REFERÊNCIAS

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

ALMEIDA, P.R.L. Acute hepatitis C treatment. **Ann. Hepatol.**, v.9, p.107-111, 2010.

ALTER, H.J.; HOUGHTON, M. Clinical Medical Research Award. Hepatitis C virus and eliminating post-transfusion hepatitis. **Nat. Med.**, v.6, n.10, p.1082-1086, 2001.

ALTER H. Viral hepatitis. **Hepatol.**, v.43, p.230-234, 2006.

BALERIOLA, C. et al. Stability of hepatitis C virus, HIV, and hepatitis B virus nucleic acids in plasma samples after long-term storage at -20°C and -70°C. **J Clin Microbiol.**, v.9, p.3163-3167, 2011.

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

BARTOSH, B.; DUBUISSON, J.; COSSET, F.I. Infectious hepatitis C virus pseudo-particles containing functional E1-E2 envelope protein complexes. **J. Exp. Med.**, v.197, n.5, p.633-642, 2003.

BARTOSH, B.; COSSET, F.L. Cell entry of hepatitis C virus. **Virol.**, v.348, p.1-12, 2006.

BEHRENS, S.E.; TOMEI, L.; DE FRANCESCO, R. Identification and properties of the RNA-dependent RNA polymerase of hepatitis C virus. **EMBO J.**, v.15, p.12 -22, 1996.

BERENQUER, J. et al. High incidence of allograft cirrhosis in hepatitis C virus genotype 1b infection following transplantation: relationship with rejection episodes. **Hepatol.**, v.29, n.1, p.250-256, 1999.

BLACKARD, J.T. et al. Compartmentalization of hepatitis C virus (HCV) during HCV/HIV coinfection. **J Infect Dis.**, v.195, p.1765-1773, 2007.

BONETTI, P. et al. Efficacy of a second cycle of interferon therapy in patients with chronic hepatitis C. **Gastroenterol.**, v.113, n.5, p.1654-1659, 1997.

BRANDÃO, A.B.M. et al. Diagnóstico da Hepatite C na prática médica: revisão da literatura. **Rev Panam Salud Publica/Pan Am J Public Health.**, v.9, p.161-168, 2001.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria da Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Inibidores de Protease (Boceprevir e Telaprevir) para o Tratamento da Hepatite C Crônica. Brasília: Ministério da Saúde; 2012.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais. Protocolo clínico e diretrizes terapêuticas para hepatite viral C e coinfeções. Brasília: Ministério da Saúde, 2011. (Série A. Normas e Manuais Técnicos).

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

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

CLARKE, B. Molecular virology of hepatitis C virus. **J. Gen. Virol.**, v. 78, p.2397-2410, 1997.

CHARLTON, M. et al. Predictors of patient and graft survival following liver transplantation for hepatitis C. **Hepatology**, v.28, n.3, p.823-830, 1998.

CHARY, A. et al. Quantitation of hepatitis C virus RNA in peripheral blood mononuclear cells in HCV-monoinfection and HIV/HCV-coinfection. **J Med Virol.**, v.84, p.431-437, 2012.

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

CHAYAMA, K.; HAYES, C.N. Hepatitis C virus: How genetic variability affects pathobiology of disease. **J Gastroenterol Hepatol.**, v.26; p.83-95, 2011.

CHERUVATTATH, R. et al. Pegylated interferon and ribavirin failures: is retreatment an option? **Dig. Dis. Sci.**, v.52, p.732-736, 2007.

CHOO, Q.L. et al. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. **Science.**, v.244, n.4902, p.359-362, 1989.

CHOO, Q.L. et al. Genetic organization and diversity of the hepatitis C virus. **Procs Natl Acad Sci USA.**, V.88, P.2451-2455, 1991.

CORNBERG, M. et al. Treatment with daily consensus interferon (CIFN) plus ribavirin in non-responder patients with chronic hepatitis C: a randomized openlabel pilot study. **J. Hepatol.**, v.44, p.291-301, 2006.

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

DAVIS, G.L.; LAU, J.Y. Factors predictive of a beneficial response to therapy of hepatitis C. **Hepatol.**, v.26, n.3, p.122-127, 1997.

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

DE ALMEIDA, A.J. et al. Detection of Hepatitis C Virus in Platelets: Evaluating its Relationship to Viral and Host Factors. **Hepatogastroenterol.**, v.75, p.964-968, 2007.

DE ALMEIDA, A.J. et al. Detection of Hepatitis C Virus in Platelets: Evaluating Its Relationship to Antiviral Therapy Outcome. **Hepatogastroenterol.**, v.90, p.429-436, 2010.

DUKE UNIVERSITY MEDICAL CENTER. Disponível em: <http://www.dukehealth.org/pages/algs.html>. Acesso novembro 2011.

DHUMEAUX, D. et al. Epidemiological factors affecting the severity of hepatitis C virus-related liver disease: A French survey of 6,664 patients. **Hepatol.**, v.26, n.2, p.485-490, 1997.

DREXLER, J.F. et al. A novel diagnostic target in the hepatitis C virus genome. **Plos Med.**, v.6, p.210-220, 2009.

DUNCAN, A.; YOUNOSSI, Z. Treatment options for nonresponders and relapsers to initial therapy for hepatitis C. **Cleveland Clinic. J. of Med.**, v.70, n.4, p.21-26, 2003.

EINAV, S. et al. A nucleotide binding motif in hepatitis C virus (HCV) NS4B mediates HCV RNA replication. **J. Virol.**, v.78, p.11288-11295, 2004.

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

EVERSON, G. T., et al. Impact of disease severity on outcome of antiviral therapy for chronic hepatitis C: Lessons from the HALT-C trial. **Hepatol.**, v.44, n.6, p.1675-1684, 2006.

FAN, H.; HEGDE, P.S. The transcriptome in blood: challengers and solutions for robust expression profiling. **Curr. Mol. Med.**, v.5, p.3-10, 2005.

FARIAS, A. et al. Detection of Hepatitis C Virus (HCV) in body fluids from HCV monoinfected and HCV/HIV coinfecting patients. **Hepatogastroenterol.**, v.57, p.300-304, 2010.

FERREIRA C.T, SILVEIRA T.R. Hepatites virais: aspectos da epidemiologia e da prevenção. **Rev. Bras. Epidemiol.**, v.7, n.4, p. 473-487, 2004.

FILIPOWICZ, M.S. Interferon therapy of hepatitis C: Molecular insights into success and failure. **Swiss Med Wkly.**, v.140, p.3-11, 2010.

FLINT, M.; MCKEATING, J.A. The role of the hepatitis C virus glycoproteins in infection. **Rev. Med. Virol.**, v.10, p.101-117, 2000.

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

FOGACCIA, R. et al. Hepatitis C: a critical analysis of therapeutic response predictors. **Braz J Infect Dis.**, v.6, p.74-81, 2002.

FRANCO, S.; CLOTET, B.; MARTÍNEZ, M.A. A wide range of NS3/4^a protease catalytic efficiencies in HCV-infected individuals. **Virus Res.**, v.131, p.260-270, 2008.

FUJIWARA, K. et al. Investigation of residual hepatitis C virus in presumed recovered subjects. **Hepatol.**, In press 2012.

GINOCCHIO, C.C. et al. Comparison of levels of Hepatitis C Virus RNA in plasma as measured by the Nuclisens nucleic acid sequence-based amplification and Quantiplex branched-DNA assays. **J Clin Microbiol.**, v.37, p.1210-1212, 1997.

GERMER, J.J.; ZEIN, N.N. Advances in the molecular diagnosis of hepatitis C and their clinical implications. **Mayo Clin. Proc.**, v.76, p.911-20, 2001.

GOTTWEIN, J.M. et al. Development and characterization of hepatitis C virus genotype 1-7 cell culture systems: Role of CD81 and scavenger receptor class b type i and effect of antiviral drugs. **Hepatology**, v.49, p.364-377, 2009.

GRIFFIN, S.D. et al. The p7 protein of hepatitis C virus forms an ion channel that is blocked by the antiviral drug, Amantadine. **FEBS Lett.**, v.535, p.34-38, 2003.

GHANY, M.G. et al. Diagnosis, Management, and Treatment of Hepatitis C: An Update. This practice guideline has been approved by the American Association for the Study of Liver Diseases. **Hepatology**, v.49, p.1335-1374, 2009.

GHANY, M.G. et al. An Update on Treatment of Genotype 1 Chronic Hepatitis C Virus Infection: 2011 Practice Guideline by the American Association for the Study of Liver Diseases This practice guideline has been approved by the American Association for the Study of Liver Diseases. **Hepatology**, v.54, p.1433-1444, 2011.

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

HIJIKATA, M. et al. Equilibrium centrifugation studies of hepatitis C virus: evidence for circulating immune complexes. **J Virol.**, v.67, p.1953–1958, 1993.

HONDA, M. et al. Degree of diversity of hepatitis C virus quasispecies and progression of liver disease. **Hepatology**, v.20, p.1144-1151, 1994.

ICHIJO, T. et al. Antibody response to E2/NS1 hepatitis C virus protein in patients with acute hepatitis C. **J. Gastroenterol. Hepatology**, v.12, n.1, p.73-76, 1997.

JACOBSON, I.M. et al. A randomized trial of pegylated interferon alpha-2b plus ribavirin in the retreatment of chronic hepatitis C. **Am. J. Gastroenterol.**, v.100, n.11, p.2453-62, 2005.

KEMMER, N.; NEFF, G.W . Managing chronic hepatitisC in the difficult-to-treat patient. **Liver Internat.**, p.1297-1310, 2007.

KIEFT, J.S. Viral IRES RNA structures and ribosome interactions. **Trends Biochem. Sci.**, v.33, n.6, p.274-283, 2008.

KRAWITT, E. L. et al. Peginterferon alfa-2b and ribavirin for treatmentrefractory chronic hepatitis C. **J. Hepatol.**, v.43, n.2, p.243-9, 2005.

KUIKEN, C.; SIMMONDS, P. Nomenclature and numbering of the hepatitis C virus. **Methods Mol Biol (Clifton) NJ.**, p.33-53, 2005.

LANDFORD, R.E.; BIGGER, C. Advances in model systems for hepatitis c virus research. **Virol.**, v.293, p.1-9, 2002.

LAU, D.T et al. 10-year follow-up after interferon- α therapy for chronic hepatitis C. **Hepatol.**, v.28, n.4, p.1121-1127, 1998.

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

LAVANCHY, D. Evolving epidemiology of hepatitis C virus. **Clin. Microbiol. and Infect.**, v.17, n.2, p.107-115, 2011.

LEE, D.H. et al. Stabilized viral nucleic acids in plasma as an alternative shipping method for NAT. **Transf.**, v.42, p.409-413, 2002.

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

MARTINS, R.M.B. et al. Distribution of hepatitis C virus genotypes among blood donors from Mid-west region of Brazil. **Rev. Inst. Med. Trop.**, São Paulo, v.48, n.1, p. 53-55, 2006.

MATTHEW, A. et al. Sustained viral response to pegylated interferon α -2b and ribavirin in chronic hepatitis C refractory to prior treatment. **Dig. Dis. Sci.**, v.51, p.1965-1961, 2006.

MCHUTCHISON, J.G. et al. Interferon alfa-2b alone or in combination with ribavirin as initial treatment for chronic hepatitis C. Hepatitis Interventional Therapy Group. **Hepatol.**, v.339, n.21, p.1485-1492, 1998.

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

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

NAITO, M.; HAYASHI, N.; KAMADA, T. Hepatitis C viral quasispecies in patients with type C chronic liver disease. **Nippon Rinsho**, v.53, suppl, pt. 1, p.613-617, 1995.

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

NEUMANN-HAEFELIN, C. et al. T cell response in hepatitis C virus infection. **J Clin Virol.**, v.32, p.75-85, 2005.

OKAMOTO, H.; MIYAKAWA, Y.; MAYUMI, M. Molecular virology of hepatitis C virus. **Viral Hepat. Rev.**, v.3, p.51-62, 1997.

PARISE, E. et al. Peginterferon alfa-2a (40KD) (PEGASYS) plus ribavirin (COPEGUS) in retreatment of chronic hepatitis C patients, nonresponders and relapsers to previous conventional interferon plus ribavirin therapy. **Brz. J. Infect Dis.**, v.10, p.11-16, 2006.

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

PAVLOVIC, D. et al. The hepatitis C virus p7 protein forms an ion channel that is inhibited by long-alkyl-chain iminosugar derivatives. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v.100, p.6104-6108, 2003.

PAWLOTSKY, J.M. Use and Interpretation of Virological Tests for Hepatitis C. **Hepatol.**, v.36, p. 565-573, 2002.

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

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

PORTARIA 221/SVS/MS: Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Portaria nº 221, de 13 de julho de 2011. Dispõe sobre protocolo clínico e diretrizes terapêuticas para a hepatite viral C e coinfeções. Diário Oficial [da República Federativa do Brasil], Brasília. Maio 2011.

POORDAD, F.F.; FLAMM, S.L. Virological relapse in chronic hepatitis C. *Antivir Ther.*, v.14, p.303-313, 2009.

POYNARD, T. et al. Impact of interferon alfa-2b and ribavirin on progression of liver fibrosis in patients with chronic hepatitis C. *Hepatol.*, v.32, n.5, p.1131-1137, 2000.

POYNARD, T. et al. Interferon for acute hepatitis C. **Cochrane Database Syst. Rev.**, v.1, p.CD000369, 2002.

POYNARD, T. et al. PegIFN alfa-2b and ribavirin: effective in patients with hepatitis C who failed IFN alfa/ribavirin therapy. **Gastroenterol.**, v.136, n.5, p.1618-1628, 2009.

PUGLIESE, A. et al. HCV infective virions can be carried by human platelets. **Cell. Biochem. Funct.**, v.22, p.353-358, 2004.

REED, K.E.; GORBALENYA, A.E.; RICE, C.M. The NS5a/NS5 proteins of viruses from three genera of the family flaviviridae are phosphorylated by associated serine/threonine kinases. **J. Virol.**, v.72, p.6199-6206, 1998.

REDDY, K.R. et al. Efficacy and safety of pegylated (40-kd) interferon alpha- 2a compared with interferon alpha-2a in non cirrhotic patients with chronic hepatitis C. **Hepatol.**, v.33, n 2, p.433-438, 2001.

ROBERTSON, 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.**, v.143, n.12, p.2493-2503, 1998.

ROINGEARD, P. et al. Hepatitis C virus ultrastructure and morphogenesis. **Biol. Cell.**, v.96, p.103-108, 2004.

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

SCHMIDT, W.N. Distribution of Hepatitis C Virus (HCV) RNA in Whole Blood and Blood Cell Fractions: Plasma HCV RNA Analysis Underestimates Circulating Virus Load. **J. Infect. Dis.**, v.176, p.20-26, 1997.

SELZNER, N. et al. Hepatic gene expression and prediction of therapy response in chronic hepatitis C patients. **J. Hepatol.**, v.48, p.708-713, 2008.

SHARMA, S.D. Hepatitis C virus: Molecular biology & current therapeutic options. **Indian J. Med. Res.**, v.131, n.1, p.17-34, 2010.

SHERMAN, M. et al. Peginterferon alfa-2a (40KD) plus ribavirin in chronic hepatitis C patients who failed previous interferon therapy. **Gut.**, v.55, n.11, p. 1631-1638, 2006.

SHUN-ICHI, A. Adaptive Blind Signal And Image Processing: Learning Algorithms and Applications. Front Matter and Index, 2003.

SIEMENS. Manual de carga viral HIV-1. Brasília: Ministério da Saúde, 2007.

SIMMONDS, P. et al. Classification of hepatitis C virus into six major genotypes and a series of subtypes by phylogenetic analysis of the NS-5 region. **J. Gen. Virol.**, v.74, p.2391-2399, 1993.

SIMMONDS, P. et al. A proposed system for the nomenclature of hepatitis C virus genotypes. **Hepatol.**, v.19, p.1321-1324, 1994.

SIMMONDS, P. et al. Consensus proposals for a unified system of nomenclature of hepatitis C virus genotypes. **Hepatol.**, v.42, p.962-973, 2005.

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

SUZUKI, R. et al. Processing and functions of hepatitis C virus proteins. **Intervirol.**, v.42, p.256-259, 1999.

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

TALIANI, G. et al. Pegylated interferon alfa-2b plus ribavirin in the retreatment of interferon-ribavirin nonresponder patients. **Gastroenterol.**, v.130, n.4, p. 1098-106, 2006.

TRIMOULET, P. et al. Quantitation of hepatitis C virus RNA in plasma and peripheral blood mononuclear cells of patients with chronic hepatitis treated with interferonalpha. **Dig Dis Sci.**, v.45, p.175-181, 2000.

YAMAGA, A.K.; OU, J.H. Membrane topology of the hepatitis C virus NS2 protein. **J. Biol. Chem.**, v.277, p.33228-33234, 2002.

YOSHIDA, E.M. et al. Retreatment with pegylated IFN alpha-2a and ribavirin in patients with chronic hepatitis C who have relapsed or not responded to a first course of pegylated IFN-based therapy. **Can. J. Gastroenterol.**, v.23, n.3, p.180-184, 2009.

ZEIN, N.N. Clinical significance of hepatitis C virus genotypes. **Clin. Microbiol. Rev.**, v.13, p.223-235, 2000.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Hepatitis C fact sheet. 2008. Available from: http://www.who.int/immunization/topics/hepatitis_c/en/index.html.

Capítulo II

Artigo submetido para publicação na revista "Journal of Medical Virology"

**HUMAN PLATELET ANTIGEN (HPA)
GENOTYPE IS ASSOCIATED WITH THERAPY
FAILURE IN PATIENTS INFECTED BY HCV**

ABSTRACT

INTRODUCTION: Treatment for chronic hepatitis C is effective in about 50% of patients treated with exogenous interferon, which induces interferon-stimulated genes leading to endogenous interferon production. Integrins are involved in interferon production and structural modifications of them can be associated with altered function. Some integrins, expressed on the platelet membrane, show polymorphic antigenic determinants called human platelet antigens (HPA). The association between HCV infection and HPA-5b has already been demonstrated, in the same way the HPA profile could be associated with therapeutic response.

OBJECTIVE: This study aimed evaluate the association between the HPA-1, -3, -5 frequencies and therapy response in HCV-infected patients. **PATIENTS AND**

METHODS: HPA genotyping was performed in 168 HCV-infected patients by PCR-

SSP or PCR-RFLP. **RESULTS:** The patients were on interferon- α (48.8%: 43.9% carriers of HCV genotype 1 and 56.1% non-1) or peginterferon (51.2%; 87.2% carriers of HCV genotype 1 and 12.8% non-1), both combined with ribavirin.

Statistical analysis was performed using the proportional odds model. The genotypic frequency of HPA-1a/1b was significantly higher in the patients with therapeutic failure (odds ratio=3.58, 95% CI -1.18 – 10.82). **CONCLUSION:** The results suggest

that the HPA-1a/1b genotype is associated with therapy failure, independent of the treatment used, viral genotype and fibrosis stage.

KEYWORDS: Hepatitis C Virus; Human Platelets Antigens; Non-responders; Sustained Virological Response.

INTRODUCTION

The hepatitis C virus (HCV) belong to the Flaviviridae family and is an important pathogen associated with chronic hepatic disease. There are around 170 million infected patients in the world [Shepard et al., 2005] and about 3 to 4 million in Brazil [Diament, 2007]. Some infected patients can develop liver cirrhosis in 20-25 years after infection, which may progress to hepatocellular carcinoma [Seeff and Hoofnagle, 2002; Barth et al., 2003].

The treatment of chronic hepatitis C is aimed at sustained virological response (SVR), defined as having undetectable HCV RNA at the end of therapy for at least 6 months [Dhumeaux et al., 2003; Fargion et al., 2004]. However new drugs are available [U.S. Food and Drug Administration, 2011] the used treatment is the combination of the pegylated interferon plus ribavirin [Wright, 2003].

Exogenous interferon induces interferon-stimulated genes (ISGs), establishing an antiviral effect [Bekisz et al., 2004]. The stimulation of ISGs produces an innate and adaptative immune response [Tang et al., 2005], leading to a reduction in viral load in plasma [Guo et al., 2001], and thus, therapeutic interferon can lead to endogenous interferon production [Feld et al., 2007].

Studies have demonstrated that interferon stimulates the expression of integrins [Tenaud et al., 2002] which are proteins involved in different biological processes including the immune response [Hynes, 2002; Martin et al., 2002]. On the other hand, integrins can play a role in interferon production [Mainiero et al., 1998].

Structural modifications in integrins due to amino acid substitutions have already been associated with altered protein function [Kim et al., 2000]. Studies have demonstrated that integrins, proteins express in different types of cells [Giltay et al., 2011], show polymorphisms. Some integrins, expressed on the platelet membrane possess several polymorphic antigenic determinants on their surface, which are called human platelet antigens (HPAs) [Verdichio et al., 2009]. The polymorphism of these antigens results from the substitution of a single amino acid in the protein due to a single nucleotide substitution in the DNA sequence that encodes the HPA. The

HPA systems most studied are HPA-1, -2, -3, -4 and -5 [Kunicki et al., 1992], of which the HPA-1, -3, -4 and -5 reside in glycoproteins of the integrin family [Metcalf et al., 2003]. These amino acid substitutions can lead to conformational alterations in the three-dimensional structure of the glycoproteins [Metcalf et al., 2003].

The different therapeutic response patterns in HCV infection are due to the influence of viral and host factors [Araujo et al., 2007]. Like HLA, HPA polymorphism has also been associated with diseases [Ohto, 1997; Santoro, 1999]. An association between HCV infection and HPA frequencies was recently demonstrated [Verdichio et al., 2009]. Previous study already demonstrated an association between HPA -1a/1b genotype and fibrosis progression [Silva et al., 2011].

In this context, the association between HPA antigens and therapeutic response can determine the HPA profile more frequently associated with SVR or therapeutic failure (non-response). The goal of this study was to determine the association between HPA-1, -3 and -5 systems [the HPA -4b allele is rare in Brazil [Torralles-Pereira et al., 2005] and therapeutic response in HCV-infected patients.

PATIENTS AND METHODS

Aliquots of EDTA-anticoagulated peripheral venous blood were collected from 168 HCV-infected patients seen at the Department of Internal Medicine, Gastroenterology Division, Botucatu School of Medicine, Sao Paulo State University, UNESP, Botucatu, SP, Brazil. Inclusion criteria were the presence of HCV infection and signed informed consent. Exclusion criteria were HBV or HIV positive serology, antiviral treatment before liver biopsy, and the presence of other hepatic diseases. The characteristics of the subjects included in this study are summarized in Table I. The study was approved by the Research Ethics Committee of Botucatu School of Medicine, UNESP.

The patients were divided into three groups: Group 1 (G1): 59 patients with sustained virological response (SVR, defined as having undetectable HCV RNA at

the end treatment and for at least 6 months thereafter); Group 2 (G2): 47 patients with initial response but relapsed (patients with undetectable HCV RNA at the end of treatment but again detectable within the following 6 months) and Group 3 (G3): 62 patients who showed therapeutic failure (non-responders, defined as patients with detectable HCV RNA at the end of treatment).

Table I: Demographic, virological and clinical characteristics of HCV infected patients included in study.

Characteristics	(N = 168)
Age, y [median (IQR)]	44.1 (36-51)
Sex, Male [N (%)]	118 (70.2)
Treatment* [N (%)]	
Interferon- α plus ribavirin	82 (48.8)
Genotype 1	36 (43.9)
Genotype non-1 (2 or 3)	46 (56.1)
Peginterferon plus ribavirina	86 (51.2)
Genotype 1	75 (87.2)
Genotype non-1 (2 or 3)	11 (12.8)
Fibrosis [N (%)]**	
No fibrosis (F0)	06 (3.60)
Portal fibrosis without septa (F1)	59 (35.1)
Portal fibrosis with few septa (F2)	32 (19.0)
Portal fibrosis with numerous septa (F3)	20 (12.0)
Cirrhosis (F4)	51 (30.3)

Y, years. IQR, interquartile range. *information collected of the patient's medical register. ** according METAVIR system.

Genomic DNA was isolated from whole blood using a commercial Brasilica kit (LGC Biotecnologia, Brazil). HPA-1 and -3 were genotyped by PCR sequence specific primers according to Klüter et al. [Klüter et al., 1996], using the C-reactive protein gene (CRP) as the internal positive control in all reactions. The HPA -5 was

genotyped by PCR restriction fragment length polymorphism according to Kalb et al. [Kalb et al., 1994].

Plasma RNA was isolated using QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN, Valencia, CA, USA) and was used as the source for HCV 5'UTR region amplification by RT-PCR using Amplicor HCV Test version 2.0 (Roche Diagnostic Systems, Branchburg, N.J). The RT-PCR product was genotyped with INNO-LiPA® v.1.0 (Innogenetics, Ghent, Belgium). All procedures were performed according to the manufacturer's specifications.

The Hardy–Weinberg equilibrium test was carried out to evaluate the distribution of gene frequencies of HPA-1, -3 and -5, according to therapeutic response. The chi-square test were used to investigate possible associations between HPA genotypes and alleles and therapy response. The level of significance for all statistical tests was set at 0.05.

The proportional odds model was performed to analyze variables that might have influenced treatment response and to determine an independent association of HPA genotypes with treatment response.

RESULTS

There was no deviation from Hardy–Weinberg equilibrium in all HPA systems evaluated. There were no significant differences ($p>0.05$) in allele frequency distribution for HPA-1, -3 and -5 between patients with sustained virological response (G1), relapsed patients (G2) and non-responders (G3) (Table II).

Table II: Allelic and genotypes frequencies for HPA -1, -3 and -5 in G1 (patients with sustained virological response), G2 (recidive) and G3 (non responders), $p < 0.05$.

	G1 (n=59)	G2 (n=47)	G3 (n=62)	<i>p value</i>
Alleles				
1 ^a	107	84	107	0.5436
1b	11	10	17	
3 ^a	92	63	86	0.1624
3b	26	31	38	
5 ^a	105	81	110	0.7924
5b	13	13	14	
Genotypes				
1a/1 ^a	52*	38*	46*	0.0314
1a/1b	03*	08*	15*	
1b/1b	04*	01*	01*	
3a/3 ^a	37	24	32	0.4749
3a/3b	18	15	22	
3b/3b	04	08	08	
5a/5 ^a	46	34	48	0.7641
5a/5b	13	13	14	

None HPA -5a/5b was founded in analyzed patients; *significance difference.

On the other hand, there was an association between HPA 1a/1b genotype and patients showing therapeutic failure (non-responders) ($p=0.0314$) (Table III) and, based on the proportional odds model, the risk factors associated with therapeutic failure (non-responders) were HPA 1a/1b genotype (odds ratio=3.58; CI=1.18 – 10.82), viral genotype 1 (odds ratio=0.23; CI=0.09 – 0.62), type of treatment (odds ratio=0.26; CI=0.10 – 0.66) and fibrosis progression (odds ratio=4.01; CI=1.97 – 8.16) (Table III).

Table III: Risk factors associated with no response to treatment – Proportional Odds Model.

Variable	Odds Ratio (95% CI)
HPA 1a/1a vs 1a/1b	3.58 (1.18 – 10.82)
HPA 1b/1b vs 1a/1b	6.37 (0.84 – 48.34)
HPA 3a/3a vs 3a/3b	1.44 (0.68 – 3.02)
HPA 3b/3b vs 3a/3b	1.03 (0.35 – 3.07)
HPA 5a/5a vs 5b/5b	0.87 (0.39 – 1.94)
Interferon- α vs peginterferon	0.26 (0.10 – 0.66)
Viral Genotype 1 vs non-1	0.23 (0.09 – 0.62)
Fibrosis Stage (F0, F1, F2) vs (F3, F4)	4.01 (1.97 – 8.16)

Model to ordinal multinomial response adjusted considering therapeutic failure (non responders) as response and HPA genotype, type of the treatment, viral genotype and fibrosis stage as risk factors.

DISCUSSION

The major goal in the treatment of HCV-infected patients is to obtain sustained virological response (SVR) and consequently undetectable HCV RNA in patient plasma [Dhumeaux et al., 2003; Fargion et al., 2004].

Treatment response is dependent on the viral genotype and therapeutic scheme. The use of peginterferon combined with ribavirin is recognized as the gold standard in HCV therapy [Di Bisceglie et al., 2002; Hoofnagle and Seeff, 2006]. Despite that the combination of peginterferon with ribavirin yields SVR levels [Manns et al., 2001; Fried et al., 2002; Hadziyannis et al., 2004], genotypes 1 and 4 show lower response to therapy compared to genotypes 2 and 3 [Shiffman et al., 2007].

Therapies based on interferon induce Interferon-stimulated genes (ISGs) in infected patients, leading to an antiviral effect [Bekisz et al., 2004] and immune response [Tang et al., 2005]. Genes involved in interferon production such as Interferon regulatory factor 7 (IRF7) and retinoic acid-inducible gene-I (RIG-I) are induced by treatment [Feld et al., 2007], suggesting that treatment can be influenced by genetic alterations.

Single nucleotide polymorphism in the INF- promoter [Huang et al., 2007] and suppressor of cytokine signaling 3 (SOCS3), responsible for the regulation of interferon- α expression [Persico et al., 2008], has been associated with therapeutic success. In this context, polymorphisms in genes related to interferon have been shown to be important.

Endogenous interferon needs to interact with its receptor in cells to carry out its biological functions [Stiehm et al., 1982]. Studies have demonstrated that interferon receptor is a protein involved in cell adhesion, namely fibronectin [Chill et al., 2003], which is frequently found associated with integrins [Rozman, 2002].

Genetic polymorphisms in integrin have been associated with HCV infection [Verdichio et al., 2009] and fibrosis progression [Silva et al., 2011].

The HPA -1 system resides in the GPIIb/IIIa glycoprotein complex that recognizes a binding motif of some adhesion proteins, including fibronectin, an interferon receptor [Chill et al., 2003].

We found that genotypic frequency of HPA -1a/1b was higher in patients showing therapeutic failure (non-responders), independent of the treatment used, viral genotype and fibrosis stage (Table III), suggesting that the occurrence of this HPA -1 genotype is somehow involved in treatment failure.

The conformational alteration in the glycoprotein resulting from the occurrence of HPA-1a/1b could be associated with therapeutic failure. Mechanisms to explain this effect can be suggested.

ACKNOWLEDGEMENTS AND DISCLOSURES

Financial support was from Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo - Programa Estadual de Hepatites Virais and FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo).

Author's declaration of personal interests: None.

Declaration of funding interests: None.

REFERENCES

Araujo ESA, Courtouké C, Barone AA. 2007. Hepatitis C Treatment: Shorter and Better? *Braz J Infect Dis* 1:118-124.

Barth H, Schafer C, Adah MI, Zhang F, Linhardt 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 heparan sulfate. *J Biol Chem* 278:41003-41012.

Bekisz J, Schmeisser H, Hernandez J, Goldman ND, Zoon KC. 2004. Human interferons alpha, beta and omega. *Growth Factors* 22:243-251.

Chill JH, Quadt SR, Levy R, Schreiber G, Anglistter J. 2003. The human type I interferon receptor: NMR structure reveals the molecular basis of ligand binding. *Structure* 11:791-802.

Dhumeaux D, Marcellin P, Lerebours E. 2003 Treatment of hepatitis C. The French consensus. *Gut* 52:1784-1787.

Diament D. 2007. Epidemiological aspects of hepatitis C in Brazil. *Braz J Infect Dis* 11:6-7.

Di Bisceglie AM, Hoofnagle JH. 2002. Optimal therapy of hepatitis C. *Hepatology* 36:121-127.

Fargion S, Fracanzani AD, Valenti L. 2004. Treatment choices for people infected with HCV. *J Antimicrob Chem* 53:708-712.

Feld JJ, Nanda S, Huang Y, Chen W, Cam M, Pusek SN, Schweigler LM, Theodore D, Zacks SL, Liang TJ, Fried MW. 2007. Hepatic gene expression during treatment with peginterferon and ribavirin: identifying molecular pathways for treatment response. *Hepatology* 46:1548-1563.

Fried MW, Shiffman ML, Reddy KR, Smith C, Marinos G, Gonçalves FL Jr, Häussinger D, Diago M, Carosi G, Dhumeaux D, Craxi A, Lin A, Hoffman J, Yu J. 2002. Peginterferon Alfa-2a plus Ribavirin for Chronic Hepatitis C Virus Infection. *N Engl J Med* 347:975-982.

Giltay JC, Brinkman HJ, Borne AE, Mourik JA. 2011. Expression of the alloantigen Zwa (or P1A1) on human vascular smooth muscle cells and foreskin fibroblasts: a study on normal individuals and a patient with Glanzmann's thrombasthenia. *Blood* 74:965-970.

Guo JT, Bichko VV, Seeger C. 2001. Effect of alpha interferon on the hepatitis C virus replicon. *J Virol* 75:8516-8523.

Hadziyannis SJ, Sette H Jr, Morgan TR, Balan V, Diago M, Marcellin P, Ramadori G, Bodenheimer H Jr, Bernstein D, Rizzetto M, Zeuzem S, Pockros PJ, Lin A, Ackrill AM. 2004. PEGASYS International Study Group. PEGinterferon-alpha2a and ribavirin combination therapy in chronic hepatitis C: a randomized study of treatment duration and ribavirin dose. *Ann Intern Med* 140:346-355.

Hoofnagle JH, Seeff LB. 2006. Peginterferon and ribavirin for chronic hepatitis C. *N Engl J Med* 23:2444-2451.

Hynes RO. 2002. Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell* 110:673-687.

Huang Y, Yang H, Borg BB, Su X, Rhodes SL, Yang K, Tong X, Tang G, Howell CD, Rosen HR, Thio CL, Thomas DL, Alter HJ, Sapp RK, Liang TJ. 2007. 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* 104:985-990.

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. *Thromb Haemost* 71:651-654.

Kim JE, Kim SJ, Lee BH, Park RW, Kim KS, Kim IS. 2000. Identification of motifs for cell adhesion within the repeated domains of transforming growth factor-beta-induced gene, betaig-h3. *J Biol Chem* 275:30907-30915.

Kunicki TJ, Newman PJ. 1992. The molecular immunology of platelet proteins. *Blood* 80:1386-1404.

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* 71:121-125.

Mainiero F, Gismondi A, Soriani A, Cippitelli M, Palmieri G, Jacobelli J, Piccoli M, Frati L, Santoni A. 1998. Integrin-mediated ras-extracellular regulated kinase (ERK) signaling regulates interferon gamma production in human natural killer cells. *J Exp Med* 188:1267-1275.

Manns MP, McHutchison JG, Gordon SC, Rustgi VK, Shiffman M, Reindollar R, Goodman ZD, Koury K, Ling M, Albrecht JK. 2001. Peginterferon alfa-2b plus ribavirin compared with interferon alfa-2b plus ribavirin for initial treatment of chronic hepatitis C: a randomized trial. *Lancet* 358:958–965.

Martin KH, Slack JK, Boerner SA, Martin CC, Parsons JT. 2002. Integrin connections map: to infinity and beyond. *Science* 296:1652-1653.

Metcalfe 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.

Ohto H. 1997. Neonatal alloimmune thrombocytopenia. *Nippon Rinsho* 9:2310-2314.

Persico M, Capasso M, Russo R, Persico E, Crocè L, Tiribelli C, Iolascon A. 2008. Elevated expression and polymorphisms of SOCS3 influence patient response to antiviral therapy in chronic hepatitis C. *Gut* 57:507-515.

Rozman P. 2002. Platelet antigens. The role of human platelet alloantigens (HPA) in blood transfusion and transplantation. *Transpl Immunol* 10:165-181.

Santoro SA. 1999. Platelet surface collagen receptor polymorphisms: variable receptor expression and thrombotic/hemorrhagic risk. *Blood* 11:3575-3577.

Seeff LB, Hoofnagle JH. 2002. National Institutes of Health Consensus Development Conference: management of hepatitis C. *Hepatology* 36:S1-S2.

Shepard CW, Finelli L, Alter MJ. 2005. Global epidemiology of hepatitis C virus infection. *Lancet Infect Dis* 5:558-567.

Shiffman ML, Suter F, Bacon BR, Nelson D, Harley H, Solá R, Shafran SD, Barange K, Lin A, Soman A, Zeuzem S, ACCELERATE Investigators. 2007. Peginterferon alfa-2a and ribavirin for 16 or 24 weeks in HCV genotype 2 or 3. *N Engl J Med* 2:124-134.

Silva GF, Grotto RMT, Verdichio-Moraes CF, Corvino SM, Ferrasi AC, Silveira LVA, Pardini MIMC. 2011. Human Platelet Antigen (HPA) genotype is associated with progression of fibrosis in Chronic Hepatitis C. *J Med Virol*. In press.

Stiehm ER, Kronenberg LH, Rosenblatt HM, Bryson Y, Merigan TC. 1982. Interferon: Immunobiology and clinical significance. *Ann Int Med* 96:80-93.

Tang KH, Herrmann E, Cooksley H, Tatman N, Chokshi S, Williams R, Zeuzem S, Naoumov NV. 2005. Relationship between early HCV kinetics and T-cell reactivity in chronic hepatitis C genotype 1 during peginterferon and ribavirin therapy. *J Hepatol* 43:776-782.

Tenaud I, Leroy S, Chebassier N, Dreno B. 2002. Modulation in vitro of keratinocyte integrins by interferon-alpha and interferon-gamma. *Int J Dermatol* 41:836-840.

Toralles-Pereira C, Pardini MIMC, Deffune E, Machado PEA. 2005. The first report of the allele HPA-4b in a Brazilian. *Virus Rev Res* 3:165-166.

U.S. Food and Drug Administration. 2011. Drugs. New Hampshire: Human Drug Information [update 2011 Jul 09; cited 2011 Sep 08]. Available from: <http://www.fda.gov>.

Verdichio-Moraes CF, Toralles-Pereira C, Grotto RMT, Silva GF, Pardini MIMC. 2009. Allelic frequencies of HPA-1 to -5 human platelet antigens in hepatitis C virus-infected patients. *J Med Virol* 81:757-759.

Wright TL. 2003. How can we identify better those with recurrent hepatitis C who will respond to therapy? What are the optimal treatment regimen and treatment duration? *Liver Transpl* 9:109-113.

Anexo

Anexo 1 - Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de Botucatu - UNESP



**Universidade Estadual Paulista
Faculdade de Medicina de Botucatu**

Distrito Rubião Junior, s/nº - Botucatu - S.P.
CEP: 18.618-970
Fone/Fax: (0xx14) 3811-6143
e-mail secretaria: capellup@fmb.unesp.br
e-mail coordenadoria: tsarden@fmb.unesp.br



Registrado no Ministério da Saúde
em 30 de abril de 1997

Botucatu, 14 de Março de 2011.

Of. 74/11-CEP

Ilustríssima Senhora
Prof^ª. Dr^ª. Rejane Maria Tommasini Grotto
Divisão de Hemocentro da
Faculdade de Medicina de Botucatu

Prezada Dr^ª. Rejane,

De ordem do Senhor Coordenador deste CEP, informo que Projeto de Pesquisa (**Protocolo CEP 3764-2011**) Avaliação da dinâmica da carga viral plaquetária na predição da resposta terapêutica de pacientes portadores do vírus da hepatite C e influência do polimorfismo HPA-1, a ser conduzido por Jovita Ramos Ariede, orientada por Vossa Senhoria e co-orientada pela Prof^ª Dr^ª Maria Inês de Moura Campos Pardini, com a colaboração de Giovanni Faria Silva, Sarita Fiorelli Dias Barreto e Silvia Maria Corvino, recebeu do relator parecer favorável aprovado em reunião de 14 de março de 2011.

Situação do Projeto: **APROVADO**. Ao final da execução deste Projeto, apresentar ao CEP "**Relatório Final de Atividades**".

Atenciosamente,

Alberto Santos Capelluppi
Secretário do CEP

Anexo 2 : Justificativa de Alteração no Título do Projeto de Pesquisa



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Botucatu

JUSTIFICATIVA DE ALTERAÇÃO NO TÍTULO DO PROJETO DE PESQUISA

Declaramos que o Projeto de Pesquisa "Avaliação da Dinâmica da Carga Viral Plaquetária na Predição da Resposta Terapêutica de Pacientes Portadores do Vírus da Hepatite C e Influência do Polimorfismo HPA- 1" aprovado pelo CEP em 14/03/2011 teve seu título alterado para "Avaliação da carga viral do Vírus da Hepatite C em diferentes compartimentos biológicos: influência na predição da recidiva virológica", sem nenhuma alteração no seu conteúdo metodológico da época de apresentação para análise do CEP.

A presente alteração foi efetuada somente para adequação do título da Dissertação de Mestrado.

Botucatu, 24 / 10 / 2012

Nome/Assinatura do(a) aluno(a)

.....Jovita Ramos Ariede.....

Jovita Ramos Ariede

Nome/Assinatura do (a) orientador (a)

.....Rejane Maria Tommasini Grotto.....

Rejane Maria Tommasini Grotto

Programa de Pós Graduação em Pesquisa e Desenvolvimento-Biotecnologia Médica.

CNPQ: 24/10/2012 08:00:00 CANTAR DE ÉTICA EM PESQUISA PPG - UNESP