

Juliana Lara Padovani

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

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina de Botucatu – Unesp, Programa
de Pós-Graduação em Biotecnologia
Médica (Mestrado Profissional) para
obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Dra Rejane Maria Tommasini Grotto

Co-Orientadora: Dra Maria Inês de Moura Campos Pardini

Botucatu - SP

2010

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

Padovani, Juliana Lara.

Detecção *in vitro* do vírus da hepatite C (VHC) em plaquetas provenientes de indivíduos não infectados expostos ao vírus / Juliana Lara Padovani. – Botucatu : [s.n.], 2010.

Dissertação (mestrado) – Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, 2010.

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

Co-orientador: Prof^a. Dr^a. Maria Inês de Moura Campos Pardini

Assunto CAPES: 21100004

1. Plaquetas (Sangue).

CDD 616.0795

Palavras chave: HPA; Plaqueta; VHC.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais,
meu irmão, meu marido
e, aos meus sogros.

AGRADECIMENTOS

A DEUS, por ter iluminado meus caminhos e conduzido minha pesquisa.

Aos 50 doadores de sangue voluntários, obrigada pela atenção, sem vocês esta pesquisa nunca se realizaria.

Ao meu esposo, por compreender minha ausência nos finais de semanas, noites e feriados que precisei me dedicar ao computador.

Aos meus pais, meus **TESOUROS, MINHA MAIOR FORTALEZA** por toda dedicação, preocupação, pelo grande incentivo e pela grande energia positiva que me passaram. OBRIGADA, por vibrarem comigo a cada fase do trabalho que se concluía com sucesso.

Ao meu irmão, por me dizer “tudo vai dar certo”.

Aos meus sogros, pelo grande incentivo e pelas palavras de apoio.

A minha orientadora Dra Rejane Maria Tommasini Grotto, pela confiança em mim depositada quando me propôs esta pesquisa, por ter guiado meus passos, permanecendo em todos os momentos ao meu lado, me dando confiança e coragem para desenvolver e enfrentar todas as situações e dificuldades, uma pessoa muito especial nessa etapa de minha vida, uma grande AMIGA.

A minha co-orientadora Dra Maria Inês de Moura Campos Pardini, por ter acreditado em minha capacidade para desenvolver esta pesquisa, pelas palavras de incentivo e motivação, por todas as oportunidades que me proporcionou, pela confiança em mim depositada.

As minhas grandes amigas Sílvia e Rô, por me “carregarem no colo” todas as vezes que precisei, pelos ensinamentos que me proporcionaram, por me incentivarem ao conhecimento da Hepatite C, pela oportunidade que me ofereceram para trabalhar na rotina dos vírus da hepatite B e C, pelas palavras de confiança, tranquilidade, apoio e incentivo.

A minha grande e verdadeira amiga Sarita, por estar sempre presente na minha vida e pela grande ajuda.

A minha grande “amigona” do peito Natália, por me ajudar em todos os momentos.

A Lenita (PUCCA), pela ajuda em várias fases da pesquisa.

Ao Maércio, pelos seus ensinamentos, pela atenção, apoio e incentivo.

As meninas do laboratório de rotina diagnósticas em biologia molecular: Regina, Lilian, Aline e Luciana.

A Chiara e a Bete, por me ajudarem em todos os momentos que precisei e pelas palavras de carinho.

A minha grande amiga Priscilla, do Laboratório de Hematologia, pelo carinho, palavras de incentivo e apoio.

Ao Daniel do laboratório de engenharia celular, pela ajuda nas fotos das plaquetas.

A Rita de Cássia Alvarado (Ritinha), pelo incentivo e palavras de coragem para enfrentar algumas fases novas, mas muito importantes na minha vida, a entrevista do mestrado e a minha qualificação.

A Janisse, pela dedicação e auxílio com as datas, recados, montagem do *datashow*, por estar sempre presente nas atividades relacionadas com a Pós-Graduação e, pelas palavras de otimismo.

A Patrícia Garcia (Paty), da agência transfusional e a Gislene, do Laboratório de Componentes Lábéis, meninas obrigada por tudo. Por me receber nas horas mais impróprias possíveis.

Ao Gilberto por ter disponibilizado tempo em sua rotina para coletar as amostras, com todo carinho e paciência.

Ao Dr. Paulo Machado e ao Dr. Giovanni Faria Silva por dividirem comigo seus conhecimentos e pelas palavras de carinho e apoio.

Ao Laboratório de Biologia Molecular, Rotinas Diagnósticas e Pesquisa Aplicada, da Divisão Hemocentro, Unesp, na pessoa da Dra Maria Inês de Moura Campos Pardini, pela disponibilização da estrutura física e materiais de consumo utilizados neste estudo.

As bibliotecárias Meire e Rose, pela correção das referências e edição da Ficha Catalográfica.

A todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para que este estudo pudesse ser realizado.

EPÍGRAFE

*O rio atinge seus objetivos
porque aprendeu a
contornar obstáculos*
(Lao- Tsé).



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

Este capítulo representa o resultado de minha participação na linha de pesquisa que estuda os Antígenos Plaquetários Humanos (HPA) e o vírus da Hepatite C (VHC). Esta linha nasceu no Laboratório de Biologia Molecular do Hemocentro de Botucatu com uma doutoranda que estudou, em caráter inédito, os Antígenos Plaquetários Humanos em pacientes infectados pelo VHC.

Desta forma, este trabalho surgiu da necessidade de responder inúmeras perguntas geradas ao final do estudo anterior e, os resultados aqui apresentados acrescentam, no ano de 2010, algumas informações a esta linha de pesquisa nascente no Laboratório de Biologia Molecular.

RESUMO

A hepatite C é uma doença crônica resultante da infecção por um vírus, o VHC, que infecta hepatócitos pela interação com um receptor de superfície celular, o CD81. No entanto, algumas proteínas de adesão já foram associadas com a entrada do vírus em hepatócitos e, têm sido relacionadas com a entrada de outros vírus em suas células alvo. O RNA do VHC já foi encontrado em plaquetas, as quais não expressam CD81, embora esta proteína esteja presente em megacariócitos. As plaquetas expressam determinantes antigênicos polimórficos em sua superfície denominados HPA. Alguns HPA residem em integrinas. Já foi demonstrada uma associação entre HPA-5b e a infecção pelo VHC. O objetivo deste estudo foi determinar a presença de RNA do VHC em plaquetas coletadas de sangue periférico de 50 doadores de sangue com RT-PCR negativa para o vírus. Estas plaquetas foram infectadas com VHC *in vitro* e incubadas a 37°C por 8-48 horas. RNA extraído foi utilizado para detectar a presença do vírus por RT-PCR e, avaliar as diferenças quantitativas na carga viral de acordo com o perfil HPA por qRT-PCR. Todas as plaquetas foram positivas para o RNA do VHC após a incubação com o vírus, o que demonstra que o vírus interage com as plaquetas *in vitro*. Foi observado um desvio no equilíbrio de *Hardy-Weinberg* no sistema HPA-1. A frequência do alelo HPA-1b foi significativamente inferior ($p < 0,05$) em plaquetas com carga viral acima de 18,4 UI/mL, sugerindo que o alelo b pode estar relacionado com menores níveis de carga viral.

Palavras Chave: VHC; HPA ; Plaqueta

ABSTRACT

Hepatitis C is a chronic disease caused by a virus, the HCV, which usually infects hepatic cells by interaction with a cell surface receptor, a tetraspanin (CD81). However, adhesion proteins already were associated with the virus entry in hepatocytes and have been related with the entry of the others virus in their host cell, too. The HCV RNA already found in platelet but it doesn't express CD81, although this protein is present in megakaryocytes. Platelets express polymorphic antigenic determinants on their surface, named HPA. Some HPA resides in transmembrane glycoprotein of integrin family. Previous study demonstrated an association between HPA -5b and HCV infection. The goal of this study was to determine the presence of HCV RNA in platelets collected from peripheral blood from 50 blood donors with RT-PCR negative for the virus. These platelets were infected *in vitro* with HCV and incubated at 37°C for 8-48 hours. RNA was then extracted and used for RT-PCR and qRT-PCR to detect the presence of the virus and evaluate quantitative differences in viral load according with the HPA profile. All platelets were positive for HCV RNA after incubation with the virus, demonstrating that the virus interacts with the platelets *in vitro*. There was deviation from Hardy–Weinberg equilibrium in the HPA-1 system. The allele frequency of HPA-1b was found to be significantly lower ($p<0.05$) in platelet with viral load upper 18.4 UI/mL, suggesting that allele b could be related with lower viral load levels.

Key words: HCV; HPA; Platelets.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Representação esquemática do VHC, evidenciando o RNA viral, core e, as proteínas do envelope (E1 e E2)	26
Figura 2. Esquema representativo do genoma do VHC, evidenciando os genes codificadores das proteínas estruturais e não estruturais e suas funções.	27
Figura 3. Árvore filogenética representando os genótipos (representados por algarismos arábicos) e subtipos (representados por letras do alfabeto), de acordo com a seqüência do genoma completo do VHC..	27
Figura 4. Esquema ilustrativo da distribuição dos Antígenos Plaquetários Humanos (HPA) nos complexos glicoprotéicos GPIa-IIa, GPIIb-IIIa e GPIb-IX da superfície da membrana plaquetária.....	32
Figura 5. Gel de agarose 2,0% evidenciando (a) marcador de peso molecular <i>Ladder</i> 100pb (LGB Biotecnologia); resultados da RT-PCR depois da incubação com o vírus por (b) 8h, (c) 16h, (d) 32h, (e) 40h, (f) 48h; (g) controle negativo da reação de RT-PCR; (h) controle negativo das plaquetas (incubadas com soro negativo); (i) controle negativo do tubo utilizado no experimento (tubo vazio incubado com soro positivo para o VHC).....	48
Figura 6. Gel de agarose 2,0% evidenciando (a) marcador de peso molecular <i>Ladder</i> 100pb (LGB Biotecnologia); (b), (c), (d), (e), (f), (g) e (h) resultados da RT-PCR de 07 doadores de plaquetas confirmando a negatividade para o VHC antes da incubação com o vírus; (i) controle negativo da reação de RT-PCR; (j) controle positivo da reação.	50
Figura 7. Gel de agarose 2,0% evidenciando (a) marcador de peso molecular <i>Ladder</i> 100pb (LGB Biotecnologia); (b), (c), (d), (e), (f), (g), (h), (i), (j), (k), (l), (m), (n), (o), (p) e (q) resultados da RT-PCR das plaquetas após incubação com o vírus; (r) controle negativo da reação de RT-PCR; (s) controle negativo das plaquetas (incubadas com soro negativo); (t) controle negativo do tubo utilizado no experimento (tubo vazio incubado com soro positivo para o VHC).51	51
Figura 8. Fotos de uma das lâminas coradas com <i>Leishman</i> , confeccionada durante o experimento, evidenciando a presença exclusiva de plaquetas, (a) objetiva de 40X, (b) objetiva de 50X, (c) objetiva de 100X	52

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Sistemas HPA -1, -2, -3, -4 e -5 evidenciando o polimorfismo no DNA e, a substituição do aminoácido conseqüente a presença do alelo a ou b	32
Tabela 2. Seqüência de primers utilizados para amplificação da região 5'UTR do genoma do VHC.	41
Tabela 3. Seqüência de primers utilizados para genotipagem plaquetária dos sistemas HPA-1, -3 e 5..	44
Tabela 4. Classificação das 50 amostras de plaquetas de acordo com o perfil HPA e a carga viral obtida a partir do RNA do VHC extraído após incubação com o vírus	58
Tabela 5. Classificação das 50 amostras de plaquetas de acordo com o perfil HPA e a detecção da presença do RNA do VHC extraído após incubação com o vírus por RT-PCR em tempo real	58
Tabela 6. Frequências alélica e genotípica dos sistemas HPA -1, -3 e -5 de acordo com a detecção da presença do RNA do VHC extraído de plaquetas após incubação com o vírus por RT-PCR em tempo real (n=50), p<0.05	59

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	22
OBJETIVOS.....	32
MATERIAL E MÉTODOS.....	34
Material Utilizado	35
Metodologia e Experimentos.....	35
1- Padronização do experimento.....	35
a) Padronização do tempo de incubação de plaquetas (a partir do Concentrado), RT-PCR negativas para o VHC com soro positivo para o RNA viral.....	35
b) Incubação de plaquetas provenientes de doadores sadios com soro de pacientes VHC positivos.....	36
c) Extração de RNA do <i>pellet</i> de plaquetas.....	37
d) Reação em Cadeia da Polimerase precedida de Transcrição Reversa (RT-PCR).....	38
e) Revelação do produto amplificado por eletroforese em gel de agarose	39
2- Genotipagem Plaquetária	39
a) Extração do DNA genômico	40
b) Amplificação dos HPA-1 e -3 por PCR-SSP	40
c) Amplificação dos HPA-5 por PCR-RFLP	41
d) Visualização do produto da PCR-RFLP em gel de poliacrilamida 6,5%	42
3-Reação em Cadeia da Polimerase precedida de Transcrição Reversa em Tempo Real (qRT-PCR)	42
4- Análise dos Resultados obtidos	43
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	45
1- Padronização do Experimento	45
a) Determinação do tempo necessário para a interação das plaquetas com o vírus	45
b) Metodologia para Extração de RNA.....	46
2-RT-PCR para detecção do RNA do VHC nos doadores.....	47
3-Análise Qualitativa da presença do RNA do VHC em plaquetas incubadas com o vírus	48
4-Análise Quantitativa do RNA do VHC em plaquetas com diferentes perfis HPA incubadas com o vírus.....	54
CONSIDERAÇÕES FINAIS	58
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	60

INTRODUÇÃO

A Hepatite C é uma doença hepática crônica provocada por um vírus de tropismo hepático, denominado Vírus da Hepatite C (VHC) ou, do inglês, *Hepatitis C Virus* (HCV) (KOFF; DIENSTAG, 1995; LAUER; WALKER, 2001). A infecção pelo vírus constitui um problema de saúde mundial, devido ao seu grande potencial de evolução para cirrose e hepatocarcinoma (STRAUSS, 2001; SZABÓ et al., 2003). No Brasil, o Ministério da Saúde estima que há três milhões de pessoas infectadas, das quais 140 mil estão na capital paulista (BRASIL, 2009).

O VHC é um vírus RNA da família *Flaviviridae*, com genoma em fita simples de polaridade positiva, com 9,7 kilobases, flanqueado por duas regiões não traduzidas (3' e 5' UTR – *untranslated region*), as quais incluem elementos necessários a replicação e tradução (LINDENBACH; RICE, 2005). Estas regiões não traduzidas delimitam uma única região aberta de leitura (*open reading frame* - ORF), a qual codifica uma única poliproteína de 3.011 resíduos de aminoácidos, que é processada originando as proteínas estruturais do core, do envelope (E1 e E2) e as proteínas não estruturais (NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A, NS5B), envolvidas na replicação viral (ROSEN; GRETCH, 1999; PENIN et al., 2004). A estrutura viral está representada na figura 1 e o genoma na figura 2.

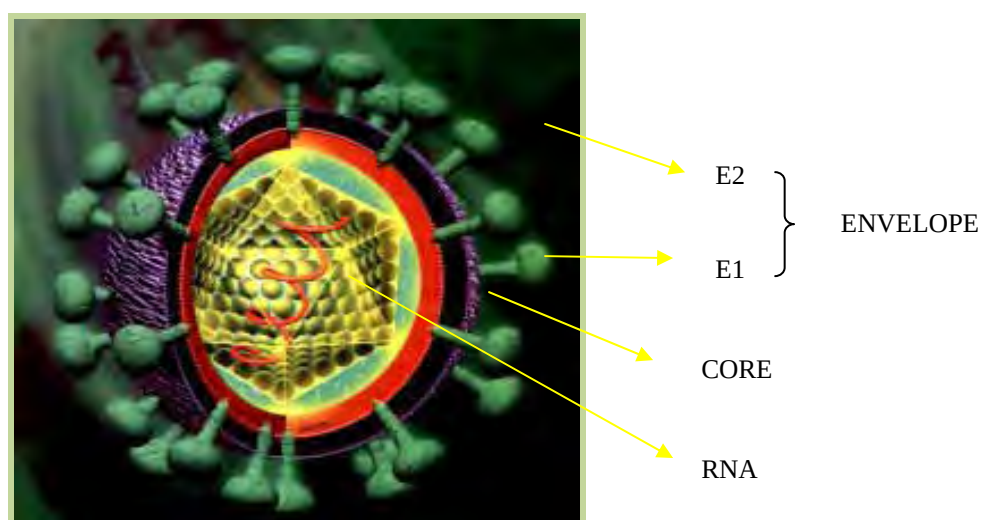


Figura 1: Representação esquemática do VHC, evidenciando o RNA viral, core e, as proteínas do envelope (E1 e E2) (Adaptado de [Duke University Medical Center](http://www.dukeupress.edu/duke-university-medical-center), 2010).

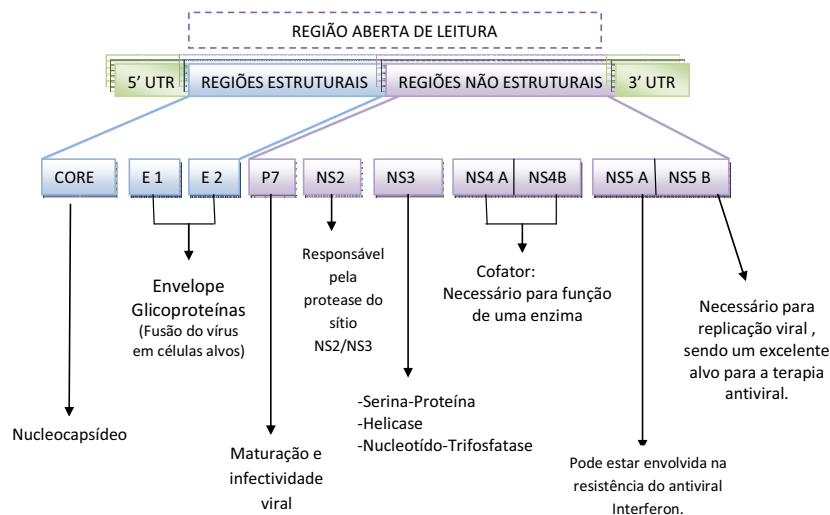


Figura 2: Esquema representativo do genoma do VHC, evidenciando os genes codificadores das proteínas estruturais e não estruturais e suas funções (Adaptado de LAUER; WALKER, 2001).

A heterogeneidade do genoma viral permite que o VHC seja filogeneticamente classificado em seis genótipos, numerados de 1 a 6, os quais divergem em aproximadamente 25 a 35% nas seqüências de nucleotídeos e, um grande número de subgrupos denominados subtipos, designados por letras do alfabeto (a, b, c), divergindo entre si de 15 a 20% de suas seqüências de nucleotídeos, com importante diferença conforme a região genômica (Figura 3) (SIMMONDS, 1998; ROBERTSON et al., 1998; ROSEN E GRETCH, 1999). A variabilidade genética do VHC é, ainda, maior quando se considera a população de variantes que ocorrem em um mesmo indivíduo infectado, as *quasispecies* (SIMMONDS et al., 1993; SIMMONDS et al., 2005).

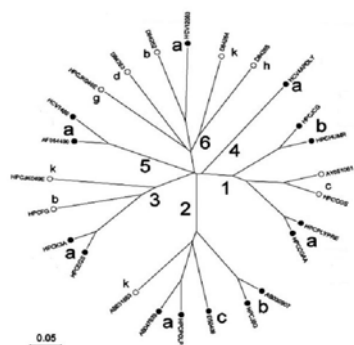


Figura 3: Árvore filogenética representando os genótipos (representados por algarismos arábicos) e subtipos (representados por letras do alfabeto), de acordo com a seqüência do genoma completo do VHC (Adaptado de SIMMONDS et al., 2005).

Os genótipos 1, 2 e 3 encontram-se distribuídos mundialmente (SIMMONDS et al., 2005), o genótipo 4 é mais prevalente no norte da África e no Oriente Médio, o 5 é mais comum na África do Sul e o 6 na Ásia (ZEIN, 2000). No Brasil, o genótipo 1 é o mais freqüentes seguido dos genótipos 3 e 2 (MARTINS et al., 2006; AMORIN et al., 2004; CAMPIOTTO et al., 2005).

Clinicamente a infecção pelo VHC apresenta evolução variada, com uma fase aguda, seguida por um longo período assintomático (COELHO, 2006). Em, aproximadamente 15 a 20 anos a infecção pode evoluir para cirrose hepática em 20% dos casos (TONG et al., 1995; CORRAO et al., 1998). O hepatocarcinoma aparece em 1 a 3% dos casos que evoluíram para cirrose ao ano (FATTOVICH et al., 1997).

Uma vez diagnosticada a infecção o clínico deve avaliar a necessidade de indicação da terapia antiviral. O principal objetivo da terapêutica na infecção pelo VHC é a obtenção de resposta virológica sustentada (RVS), ou seja, obtenção de níveis indetectáveis de RNA do VHC no plasma ou soro por seis meses após o final do tratamento (DHUMEAUX et al., 2002; LINDSAY, 2002).

A Reação em Cadeia da Polimerase precedida de uma reação de transcrição reversa (RT-PCR) vêm sendo a técnica mais utilizada para o acompanhamento da eficácia da resposta ao tratamento, por apresentar grande sensibilidade e especificidade (JUNGKIND, 2001).

A metodologia de RT-PCR para o VHC pode ser empregada para detecção qualitativa e quantitativa do vírus. Metodologias qualitativas são utilizadas para confirmar a presença do RNA viral no plasma após a infecção, antes de iniciar o tratamento e durante o acompanhamento da terapia instituída (HONDINKA, 1999; BRANDÃO, 2001). Os testes quantitativos indicam o declínio do RNA viral no plasma ou soro do paciente infectado durante a terapia antiviral (GARSON et al., 1990; ZAAIJER et al., 1993). As metodologias moleculares tanto qualitativas quanto quantitativas apresentam diferentes estratégias, no entanto, a eficácia destas deve ser equivalente independente do genótipo VHC presente na amostra (CONTE, 2000). Desta forma, uma das regiões do genoma viral suficientemente conservada para a

realização de ensaios do tipo PCR é a 5'UTR pois tais estruturas são utilizadas pelo vírus como uma *Internal Ribosomal Entry Site* (IRES), ou seja, uma região de início de tradução da informação genética em proteínas (BUSTIN 2000, 2002). Entretanto, nos últimos anos outra região alvo foi proposta, a região denominada cauda X (*X-tail*) localizada na extremidade 3'UTR, a qual também é altamente conservada entre os genótipos e subtipos virais (DREXLER et al., 2009).

Atualmente o tratamento antiviral vem sendo realizado com interferon α recombinante ou interferon peguilado, ambos em associação com a ribavirina. Apesar da reconhecida superioridade do tratamento com interferon peguilado (ZEIN et al., 1996; HNATYSZEYN, 2005), a instituição do esquema terapêutico se encontra na dependência do genótipo viral. Pacientes portadores de vírus de genótipo 2, 3 e 5 são tratados com interferon convencional e, o interferon peguilado é utilizado em pacientes com vírus de genótipos 1 e 4, uma vez que estes genótipos apresentam menor resposta virológica sustentada (RVS) (ZEIN et al., 1996; FARCI; PURCELL, 2000; HNATYSZEYN, 2005).

Desta forma, a genotipagem viral deve ser realizada pré-tratamento para a indicação do esquema terapêutico (SCOTT; GRETCH, 2007). Apesar das várias tecnologias disponíveis para a genotipagem viral, a genotipagem por seqüenciamento do genoma viral é considerada padrão ouro. O seqüenciamento de várias regiões genômicas pode ser utilizado para a genotipagem viral, no entanto vários estudos vêm utilizando o seqüenciamento de mais de uma região para a caracterização do genótipo e subtipo viral (SANDRES-SAUNÉ et al., 2003).

No entanto, independente do genótipo o VHC apresenta tropismo pelo tecido hepático. O ciclo de replicação do vírus tem início com a interação das glicoproteínas do envelope viral, E1 e E2 com um receptor na superfície celular, o CD81, uma tetraspanina, encontrada na membrana celular de alguns tipos celulares, inclusive em hepatócitos (FLINT et al., 2001). Após esta interação inicial, segue-se 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 última (fita negativa) será utilizada para a síntese de várias outras fitas de RNA. As fitas positivas podem sofrer tradução ou constituir o genoma dos novos vírus em formação. A síntese protéica ocorre, inicialmente, 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 empacotadas e novos vírus são liberados por exocitose (BARTENSCHLAGER; LOHMANN, 2000; RICE; LINDENBACH, 2005).

A entrada do vírus nas células alvo constitui uma etapa fundamental para que o genoma viral possa dirigir a síntese de proteínas virais e assim, produzir novos vírus. Este processo de entrada se encontra na dependência de interações entre componentes virais, principalmente proteínas do envelope e fatores celulares de superfície do hospedeiro (BURLONE; BUDKOWSKA, 2009).

Esclarecer o mecanismo de entrada do VHC nas células alvo é difícil pois não existe modelo animal e sistema de cultura apropriados. Apesar disso, várias moléculas de superfície celular são consideradas receptores ou co-receptores essenciais para a entrada do VHC nas células. Depois dos anos 90 foram identificadas as principais moléculas celulares envolvidas na entrada do VHC: a tetraspanina CD81 (PILERI et al., 1998), o receptor *scavenger* tipo B classe I (SR-BI/Cla1) (SCARSELLI et al., 2002), a claudulina-1 (CLDN-1) (EVANS et al., 2007) e ocludinas (LIU et al., 2009). Além dessas, algumas glicosaminoglicanas também vêm sendo associadas à adesão e entrada do VHC nas células (AGNELLO et al., 1999; CORMIER et al., 2004). Outros estudos sugerem a participação de proteínas de adesão celular na entrada do VHC. No entanto, o mecanismo exato de entrada do vírus nas células permanece, ainda, desconhecido (BURLONE; BUDKOWSKA, 2009).

Quando se consideram os receptores e co-receptores virais como determinantes de tropismo viral (MADDON et al., 1986), diferentes moléculas expressas na superfície de várias células podem mediar a entrada dos vírus

em suas células alvo. No entanto, vem sendo demonstrado que muitos vírus utilizam moléculas envolvidas na adesão celular como receptores ou co-receptores de entrada, por exemplo, a molécula de adesão celular do tipo 1(ICAM) para rinovírus (GREVE et al., 1989; STAUNTON, 1989), integrinas para echovírus (BERGELSON et al., 1992) e adenovírus (WICKHAM et al., 1993).

Desta forma, as moléculas de adesão celular são utilizadas por alguns vírus para sua entrada na célula alvo e vários tipos celulares apresentam estas moléculas em sua superfície, entre elas as plaquetas (HYNES, 1992).

Embora as células alvo do VHC sejam os hepatócitos, existem relatos da presença do vírus em outras células humanas. Estudos mostraram que os linfócitos T e B (PAVIO; LAI, 2003), monócitos, macrófagos (MULLER et al., 1995), células dendríticas (NAVAS et al., 2002) e plaquetas já foram associados à presença do RNA do VHC (HERNANDEZ et al., 1998).

As plaquetas são fragmentos citoplasmáticos anucleados derivados de megacariócitos, células presentes na medula óssea e, liberadas na circulação para garantir a integridade do sistema vascular (ITALIANO et al., 2002; SJOBRING et al., 2002). A adesão e agregação plaquetária nos locais de lesão vascular são mediadas por glicoproteínas expressas na membrana da plaqueta (KUNICKI et al., 1993; SANTOSO; KIEFEL, 1998), que além de atuarem na função hemostática, são imunogênicas. (RUGGERI 1997, 2002).

Vários antígenos são expressos em plaquetas, sendo que entre os de maior relevância clínica estão os antígenos eritrocitários, antígenos HLA (*Human Leucocyte Antigens*) e antígenos plaquetários humanos, HPA (*Human Platelet Antigens*) (SCHOEDER et al., 1993).

Vários antígenos HPA foram descritos, sendo que os sistemas designados HPA -1, HPA -2, HPA -3, HPA -4 e HPA -5 são os principais. Estes antígenos são formados por segmentos protéicos polimórficos situados no interior das glicoproteínas GPIa-IIa, GPIIb-IIIa e GPIb-IX da membrana

plaquetária. O polimorfismo, na maioria destes antígenos, é devido à substituição de um único aminoácido na proteína, em consequência da substituição de um nucleotídeo no DNA (Tabela 1) (METCALFE et al., 1995; LUCAS; METCALFE, 2000). Estes sistemas são dialélicos, apresentam hereditariedade autossômica codominante (KIEFEL et al., 1989; NEWMAN et al., 1989; LYMAN et al., 1990; KUIJPERS et al., 1992; WANG et al., 1992) e nomenclatura seguindo a ordem cronológica de sua frequência, sendo o de maior frequência designado “a” e o de menos frequência “b” (METCALFE et al., 2003). A figura 4 mostra os sistemas HPA -1 a -5 nas glicoproteínas plaquetárias na qual residem.

Tabela 1: Sistemas HPA -1, -2, -3, -4 e -5 evidenciando o polimorfismo no DNA e, a substituição do aminoácido conseqüente a presença do alelo a ou b. (Adaptado de TORALLES-PEREIRA, 2001).

Sistema	Antígenos Plaquetários	Glicoproteína	Base original/mutada	aa original/mutado
HPA -1	HPA -1a	GPIIIa	T ¹⁹⁶ /C ¹⁹⁶	Leucina ³³ / Prolina ³³
	HPA -1b			
HPA -2	HPA -2a	GPIb	C ⁵²⁴ /T ⁵²⁴	Treonina ¹⁴⁵ /Metionina ¹⁴⁵
	HPA -2b			
HPA -3	HPA -3a	GPIIb	T ²⁶²² /G ²⁶²²	Isoleucina ⁸⁴³ /Serina ⁸⁴³
	HPA -3b			
HPA -4	HPA -4a	GPIIIa	G ⁵²⁶ /A ⁵²⁶	Arginina ¹⁴³ /Glutamina ¹⁴³
	HPA -4b			
HPA -5	HPA -5a	GPIa	G ¹⁶⁴⁸ /A ¹⁶⁴⁸	Ac. Glutâmico ⁵⁰⁵ /Lisina ⁵⁰⁵
	HPA -5b			

aa: aminoácido; HPA: antígeno plaquetário humano; número em vermelho: posição do nucleotídeo na sequência gênica; número em azul: posição do aminoácido na cadeia polipeptídica.

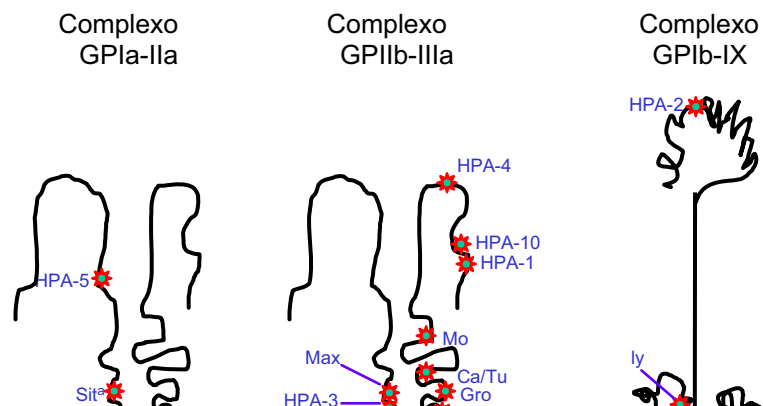


Figura 4: Esquema ilustrativo da distribuição dos Antígenos Plaquetários Humanos (HPA) nos complexos glicoprotéicos GPIa-IIa, GPIIb-IIIa e GPIb-IX da superfície da membrana plaquetária. (TORALLES-PEREIRA, 2001).

Dessa forma, as plaquetas podem estar associadas à infecção pelo VHC. Os portadores de hepatite C crônica apresentam freqüentemente trombocitopenia (PECK, 2000) e, o RNA do VHC já foi encontrado em plaquetas (HAMAIA, LI et al., 2001; ALMEIDA et al., 2004). No entanto, ainda não é conhecido o mecanismo pelo qual o vírus interage com as plaquetas.

O principal receptor de superfície celular associado à entrada do VHC em suas células alvo e outros tipos celulares é o CD81 (HAMAIA, LI et al., 2001), proteína da superfamília das tetraspaninas, cujos membros normalmente formam complexos moleculares com as glicoproteínas da família das integrinas (BERDITCHEVSKI, 2001). No entanto, esta proteína (CD81) não é expressa em plaquetas (HAMAIA, LI et al., 2001), devendo, existir, outra proteína na superfície das plaquetas que participe da interação do vírus com as plaquetas. Possíveis candidatos poderiam ser os antígenos HPA -1, -3 e -5, que residem em proteínas da família das integrinas, uma vez que o CD81 é encontrado complexado a este tipo de molécula protéica, e ainda outros vírus utilizam este tipo de proteína como receptores de entrada. Além disso, um estudo recente demonstrou uma associação entre o aumento da freqüência alélica do HPA-5b em portadores de VHC quando comparados ao grupo controle, sugerindo uma possível associação entre a presença deste alelo e a doença (VERDICHIO-MORAES et al., 2009).

Neste contexto, uma mudança na estrutura tridimensional destas glicoproteínas plaquetárias, provocada por um polimorfismo nos sistemas HPA, poderia facilitar ou dificultar a interação do VHC com plaquetas.

A proposta deste estudo foi avaliar *in vitro*, a presença do RNA do VHC em plaquetas provenientes de doadores com diferentes perfis HPAs, expostas ao vírus.

OBJETIVOS

- ✓ Determinar, experimentalmente, a presença do RNA do VHC associado às plaquetas, após exposição *in vitro*;
- ✓ Avaliar a variação quantitativa do VHC após incubação com plaquetas com diferentes perfis HPAs.

MATERIAL E MÉTODOS

Material Utilizado

Foram utilizadas neste estudo, amostras de sangue total provenientes de 50 doadores voluntários, os quais foram convidados a participar do estudo. Somente foram incluídas amostras de doadores que forneceram seu consentimento livre e esclarecido por escrito.

Foram, também utilizadas, amostras de soro proveniente de pacientes com RT-PCR positivas para o VHC, armazenadas no repositório de amostras do Laboratório de Biologia Molecular do Hemocentro de Botucatu, Unesp.

Metodologia e Experimentos

1- Padronização do experimento

a) Padronização do tempo de incubação de plaquetas RT-PCR negativas para o VHC com soro positivo para o RNA viral

Em uma primeira fase do estudo, para a determinação experimental da presença do RNA do VHC associado às plaquetas, foram utilizados 40mL de concentrado de plaquetas obtidas a partir de 500mL de sangue de doador de sangue voluntário do Hemocentro de Botucatu, após processamento, segundo o Procedimento Operacional Padrão (POP), no Laboratório de Componentes Lábeis do Hemocentro de Botucatu.

O concentrado de plaquetas foi mantido sob homogeneização horizontal em agitador de plaquetas *Horizon Series Platelet Agitator (Helmer, USA)* até o momento de sua utilização. Este concentrado foi encaminhado ao laboratório de Biologia Molecular do Hemocentro de Botucatu, onde foi fracionado em várias alíquotas de 1 mL.

A cada alíquota foi, então, adicionado 1 mL de um *pool* de soro com RNA do VHC de genótipo 1 detectável por RT-PCR. As alíquotas foram, então, incubadas a 37°C, sob agitação horizontal em *Incubator Shaker* (*New Brunswick Scientific*, USA) a uma velocidade de 30xg por diferentes intervalos de tempo 8, 16, 32, 40, 48 horas. Decorrido o tempo de incubação, todas as alíquotas foram submetidas ao processo de lavagem de plaquetas para a retirada de todo o soro. Esta lavagem foi realizada com 10 mL de solução fisiológica seguida de centrifugação a 1500xg por 5 minutos, segundo procedimento operacional padrão do Laboratório de Componentes Lábeis do Hemocentro de Botucatu. Este procedimento de lavagem foi realizado cinco vezes para cada alíquota.

Paralelamente foram realizados dois controles negativos: o primeiro controle negativo foi uma alíquota do concentrado de plaquetas, a qual foi submetida ao mesmo procedimento descrito anteriormente, no entanto com adição do soro negativo para o VHC; o segundo controle negativo foi um tubo vazio (sem plaquetas ou soro), no qual teria sido anteriormente adicionado soro positivo para o VHC, submetido aos mesmos procedimentos descritos acima. O primeiro controle negativo garante a negatividade do material experimental; o segundo controle negativo garante que nenhum RNA presente no soro fique adsorvido na parede do tubo utilizado.

Ao término da lavagem, o *pellet* de plaquetas foi transferido para um microtubo do tipo eppendorf de 1,5mL e armazenado a -80°C até o processamento.

b) Incubação de plaquetas provenientes de doadores sadios com soro de pacientes VHC positivos

Em uma segunda fase do estudo, para avaliação qualitativa da presença do VHC em plaquetas foram utilizadas 50 amostras de 5mL de sangue de doadores voluntários, coletados em tubo do tipo *vacutainer*[®] com o anticoagulante ácido etilenodiaminotetracético (EDTA).

De cada amostra de sangue total, foi separada uma alíquota de 500µL de sangue total, a qual foi utilizada para genotipagem plaquetária. Após a obtenção desta alíquota o tubo foi centrifugado por 3 minutos a 1312xg para separação de uma alíquota de plasma, que foi utilizada para comprovar a ausência do VHC no doador por RT-PCR. Estas duas alíquotas (sangue total e plasma) foram armazenadas em freezer -80°C para posterior processamento.

Em seguida, as amostras foram processadas para a obtenção das plaquetas segundo protocolo padronizado no Laboratório de Componentes Lábeis do Hemocentro de Botucatu. Após a separação do plasma foi realizada uma centrifugação a 1600xg por 5 minutos; o sobrenadante foi desprezado e o *pellet* de plaquetas obtido foi lavado cinco vezes com 1 mL de salina fisiológica. Durante este procedimento experimental alíquotas retiradas do *pellet* de plaquetas foram utilizadas para a confecção de um esfregaço em lâmina, o qual foi corado com *Leishmann* para comprovação da presença, exclusiva, de plaquetas.

Todos os *pellets* de plaquetas foram ressuspensos em 1 mL de soro com 100.000 cópias de RNA/mL do VHC de genótipo 1, proveniente do repositório de amostras do Laboratório de Biologia Molecular, do Hemocentro de Botucatu e, incubados à 37°C no *Incubator Shaker* (New Brunswick Scientific, USA) por 48h sob homogeneização horizontal à 30xg.

Durante todo o procedimento foram realizados dois tipos de controles negativos conforme descrito no item a.

Após a etapa de incubação, os *pellets* foram submetidos à nova lavagem com salina fisiológica, segundo procedimento anteriormente descrito. O *pellet* foi, então, armazenado à -80°C até processamento.

c) Extração de RNA do *pellet* de plaquetas

A extração de RNA a partir do *pellet* de plaquetas foi realizada utilizando uma etapa inicial de lise com *Buffer RLT* (QIAGEN, Valencia, CA, USA), seguida do isolamento do RNA utilizando o *QIAamp Viral RNA Mini Kit* (QIAGEN, Valencia, CA, USA). Todo o procedimento foi realizado segundo as especificações do fabricante.

Também foi utilizado o *QIAamp RNA Blood Mini Kit* (QIAGEN, Valencia, CA, USA), segundo as especificações do fabricante, durante a etapa de padronização do experimento.

d) Reação em Cadeia da Polimerase precedida de Transcrição Reversa (RT-PCR)

A RT-PCR foi realizada no plasma separado da alíquota de sangue dos doadores voluntários com a finalidade de comprovar a ausência do vírus. Esta reação, também, foi utilizada para detectar a presença do RNA viral após incubação das plaquetas do doador com o soro positivo para o VHC.

A reação de transcrição reversa foi realizada utilizando o *High-Capacity cDNA Archive kit* (Applied Biosystems), segundo as especificações do fabricante.

A reação de amplificação utilizada foi a Nested-PCR para a região 5'UTR do genoma viral, utilizando uma mistura de reação contendo 1X Buffer (LGC Biotecnologia), 1,5 mM de MgCl₂ (LGC Biotecnologia), 0,4mM de dNTP (Applied Biosystems), 0,2μM de cada *primer*, 2,5U de *Easy Taq DNA polimerase* (LGC Biotecnologia – 5U/μL) num volume total de reação de 50μL. Na primeira reação utilizou-se 100ng de cDNA e na segunda reação (Nested-PCR) 5μL do produto amplificado na primeira PCR. As condições de ciclagem foram 94°C por 1 minuto, 35 ciclos de 94°C por 1 minuto, 55°C por 1 minuto e 72°C por 1minuto, com uma etapa final de extensão de 72°C por 7 minutos. A tabela 2 mostra as seqüências dos *primers* utilizados bem como a fase de amplificação em que cada *primer* foi utilizado (Primeira PCR ou Nested-PCR).

Em todas as reações de RT-PCR foram realizados controles negativos (mistura de reação com água no lugar de RNA) para controle da reação de amplificação.

Tabela 2: Sequência de *primers* utilizados para amplificação da região 5'UTR do genoma do VHC.

<i>Primer</i>	<i>Sequência (5' → 3')</i>	<i>Reação</i>	<i>Posição*</i>	<i>Referência</i>
PTC1	CGT TAG TAT GAG TGT CGT GC	1 ^ª PCR	81-100	Garson <i>et al.</i> , 1990
NCR2	ATA CTC GAG GTG CAC GGT CTA CGA GAC CT	1 ^ª PCR	323-351	Garson <i>et al.</i> , 1990
PTC3	AGT GTC GTG CAG CCT CCA GG	<i>Nested</i> -PCR	99-118	Garson <i>et al.</i> , 1990
NCR4	CAC TCT CGA GCA CCC TAT CAG GCA GT	<i>Nested</i> -PCR	288-313	Garson <i>et al.</i> , 1990

Y= T ou C; K= T ou G; R= A ou G; V= A, G ou C; N= A, T, C ou G

* Posição de acordo com a sequência VHC-1 (nº de acesso no *GenBank*: M62321)

e) Revelação do produto amplificado por eletroforese em gel de agarose

A revelação do produto amplificado foi realizada em gel de agarose 2% com 0,25ng/μL de brometo de etídio. A corrida eletroforética foi realizada a 100V, 4mA por 20 minutos em tampão TBE (Tris-Borato 45mM/EDTA 1mM). A visualização foi realizada sob luz ultra-violeta (UV) e, foram consideradas RT-PCR positivas amostras que exibiam uma banda de 214 pares de base (pb) utilizando como marcador de peso molecular o *Ladder 100pb* (LGC Biotecnologia).

2- Genotipagem Plaquetária

A genotipagem dos sistemas HPA-1 e -3 foi realizada por PCR-SSP (*Polymerase Chain Reaction – Sequence Specific Primers*) e do sistema HPA-5 pela técnica PCR-RFLP (*Polymerase Chain Reaction – Restriction Fragment Length Polymorphism*) a partir do DNA genômico.

a) Extração do DNA genômico

A genotipagem plaquetária foi realizada a partir de DNA extraído da alíquota de sangue total obtida dos 50 doadores voluntários.

A lise dos glóbulos vermelhos foi realizada utilizando *Buffer EL* (QIAGEN, Valencia, CA, USA), segundo especificações do fabricante. Ao final desta etapa foi obtido um *pellet* de glóbulos brancos.

O DNA genômico foi extraído dos glóbulos brancos conforme protocolo *in house* descrito a seguir:

Ao *pellet* foi adicionado 0,8mL de TKM-2 (10 mM Tris HCl pH 7,6; 10 mM KCl; 10 mM MgCl₂; 0,4 M NaCl; 2 mM EDTA) e 50µL de dodecil sulfato de sódio (SDS) a 10%. Homogeneizou-se bem com auxílio da pipeta de transferência. Incubou-se por uma hora a 56°C. A seguir foi adicionado 360µL de Cloreto de Sódio 5M, homogeneizando bem. Centrifugou-se em rotação máxima por 5 minutos e o sobrenadante foi recolhido. O DNA foi precipitado com dois volumes de etanol absoluto (*Merck S.A*) gelado. Homogeneizou-se por inversão várias vezes até que o DNA precipitasse. Retirou-se o DNA com auxílio de alça estéril, o qual foi transferido para um microtubo do tipo *eppendorf* de 1,5mL. Adicionou-se 1 mL de etanol 70% (*Merck S.A*). Centrifugou-se em rotação máxima a 4°C por cinco minutos e desprezou-se o sobrenadante com auxílio de pipeta de transferência. O *pellet* foi seco a temperatura ambiente ou, se necessário, em termobloco a 56°C e, eluído em aproximadamente 100µL de água ultrapura para biologia molecular.

b) Amplificação dos HPA-1 e -3 por PCR-SSP

A reação de PCR-SSP foi realizada com 1X *Buffer* (*Invitrogen, Life Technologies*), 0,2mM de dNTP (*Applied Biosystems*) 2,0mM de MgCl₂ (*Invitrogen, Life Technologies*), 0,5µM de cada *primer* do controle interno (CRP) (Tabela 3), 0,5µM de cada *primer* para amplificação de um antígeno

específico (Tabela 3), 50ng de DNA genômico, 0,1U de *PLATINUM Taq DNA Polimerase* (Invitrogen, Life Technologies) em uma reação de 20µL. As condições de ciclagem foram 95°C por 10 minutos, 10 ciclos de 95°C por 15 segundos, 69°C por 30 segundos e 72°C por 15 segundos, 25 ciclos de 95°C por 15 segundos, 63°C por 30 segundos e 72°C por 15 segundos, com uma etapa final de extensão de 72°C por 10 minutos. Os produtos da PCR foram visualizados em eletroforese em gel de agarose 2%, conforme procedimento já descrito no item 1e. Para a validação do ensaio utilizou-se o controle interno, somente foram analisadas amostras que apresentaram uma banda de 440pb referente ao controle interno da reação. Na ausência desta banda a reação foi repetida. A amplificação foi confirmada pela presença de uma banda de 196pb para o HPA -1 e 290pb para o HPA -3.

c) Amplificação dos HPA-5 por PCR-RFLP

A reação de PCR-RFLP foi realizada com 1X *Buffer* (Invitrogen, Life Technologies), 0,16mM de dNTP (*Applied Biosystems*), 1,5mM de MgCl₂ (Invitrogen, Life Technologies), 0,28µM de cada *primer* (Tabela 3), 62ng de DNA e 1,5U de *Taq DNA Polimerase* (Invitrogen, Life Technologies) em um volume total de 50µL. As condições de ciclagem foram 94°C por 5 minutos, 35 ciclos de 94°C por 55 segundos, 51°C por 55 segundos e 72°C por 90 segundos, com uma etapa final de extensão de 72°C por 10 minutos. Os produtos da PCR foram visualizados em eletroforese em gel de agarose 2%, conforme procedimento já descrito no item 1e. A amplificação foi confirmada pela presença de uma banda de 274pb. Os produtos amplificados (20µL) foram submetidos à restrição utilizando 1U da enzima *MnII* (Biolab®) a 37°C *overnight*.

Tabela 3: Sequência de *primers* utilizados para genotipagem plaquetária dos sistemas HPA-1, -3 e 5.

Sistema	Especificidade	Nome	Sequência (5' → 3')
---------	----------------	------	---------------------

HPA-1 ⁽¹⁾	1a	HPA-1a-I	ACT TAC AGG CCC TGC CTC T
	1b	HPA-1b-I	ACT TAC AGG CCC TGC CTC C
	Comum a -1	HPA-1-II common	GTG CAA TCC TCT GGG GAC T
HPA-3 ⁽¹⁾	3a	HPA-3a-II	GGG GGA GGG GCT GGG GA
	3b	HPA-3b-II	GGG GGA GGG GCT GGG GC
	Comum a -3	HPA-3-I common	GGC CCT GGG ACT GTG AAT G
HPA-5 ⁽²⁾	GPIa	GPIa-Fow	GTG ACC TAA AGA AAG AGG
		GPIa-Rev	CTC TCA TGG AAA ATG GCA G
Controle ⁽¹⁾	CRP	CRP-I	CCA GCC TCT CTC ATG CTT TTG GCC AGA CAG
Positivo	CRP	CRP-II	GGG TCG AGG ACA GTT CCG TGT AGA AGT GGA

(1) *Primers* descritos por KLÜTER et al., 1996; (2) *primers* descritos por KALB et al., 1994

d) Visualização do produto da PCR-RFLP em gel de poliacrilamida 6,5%

A revelação da PCR-RFLP foi realizada em gel de poliacrilamida 6,5%. A corrida eletroforética foi realizada a 110V por 40 minutos em tampão TBE (Tris-Borato 45mM/EDTA 1mM). Para visualização os géis foram corados por nitrato de prata conforme descrito por Sanguinetti e colaboradores (1994).

O resultado foi interpretado de acordo com o padrão de bandas obtido no gel, a presença de duas bandas de 97 e 136pb caracterizavam o genótipo HPA -5a/5a, duas bandas de 97 e 169pb demonstravam o genótipo HPA -5b/5b e, três bandas de 97, 136 e 169 caracterizavam o heterozigoto HPA -5a/5b. Para esta análise foi utilizado o marcador de peso molecular *Ladder 100pb* (LGC Biotecnologia).

3-Reação em Cadeia da Polimerase precedida de Transcrição Reversa em Tempo Real (qRT-PCR)

Para as análises em tempo real a extração de RNA foi realizada utilizando uma etapa inicial de lise com Buffer RLT (QIAGEN, Valencia, CA, USA), seguida do isolamento do RNA utilizando o *QIAamp Viral RNA Mini Kit* (QIAGEN, Valencia, CA, USA). Todo o procedimento foi realizado segundo as especificações do fabricante. Simultaneamente foi realizada a extração de um vírus calibrador (vírus sintético produzido *in house*), utilizado como controle

interno. O vírus calibrador utilizado seguiu a estratégia desenvolvida por Drosten e colaboradores (2006).

O RNA extraído foi utilizado para as análises por PCR em Tempo Real. A transcrição reversa e amplificação para o RT-PCR em Tempo Real foram realizadas com o kit *One Step RT-PCR* (Promega Corporation, Madison, WI, USA), utilizando os *primers* F5 (GTGGCTCCATCCTAGT) e R2 (TGCGGCTCACACCTTT) para a região 3'UTR do VHC segundo especificações do fabricante. A reação está baseada na tecnologia *Taqman*®. Os *primers* e sonda 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 presente nas plaquetas 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 seguintes 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 (30.000, 300.000, 3.000.000), os quais foram amplificados, em poços separados, com os mesmos *primers* e sondas utilizadas para o vírus selvagem (DROSTEN et al., 2006). Em todas as reações os controles foram processados em triplicata. 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.

4- Análise dos Resultados obtidos

Para a análise qualitativa da presença do RNA do VHC em plaquetas RT-PCR negativas para o vírus após incubação com soro positivo foi utilizada uma análise descritiva dos resultados encontrados.

O equilíbrio de *Hardy-Weinberg* foi realizado para avaliar a distribuição de freqüências alélicas dos sistemas HPA-1, -3 e -5.

O teste de qui-quadrado (χ^2) foi utilizado para investigar possíveis associações entre o nível de carga viral obtido e (a) o perfil HPA completo dos indivíduos, (b) as freqüências genotípicas dos sistemas independentes, (c) as freqüências alélicas dos sistemas independentes. Este teste estatístico foi realizado utilizando o *GraphPad Instat Program*®, considerando 0,05 o nível de significância em todas as análises.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

1- Padronização do Experimento

a) Determinação do tempo necessário para a interação das plaquetas com o vírus

A primeira etapa do estudo consistiu na padronização do experimento. Por ocasião do delineamento do estudo, nenhuma evidência sobre o tempo necessário para que o VHC interagisse com as plaquetas havia sido reportada na literatura. No entanto, já havia sido demonstrada a presença do RNA do VHC em plaquetas em pacientes infectados (HERNANDEZ et al., 1998).

Desta forma, para padronização do experimento vários tempos de incubação das plaquetas provenientes dos doadores sadios (8, 16, 32, 40, 48

horas) com um *pool* de soros VHC positivos foram testados. Nesta fase do estudo foi utilizado o concentrado de plaquetas e, para cada tempo, foram realizadas três repetições. Após a incubação das plaquetas com o *pool*, todas as amostras foram positivas para o RNA viral por RT-PCR independente do tempo de incubação. Os controles negativos utilizados no experimento foram RT-PCR negativos o que validou o ensaio, evidenciando ausência de contaminação das amostras e ausência de adsorção do RNA viral ao tubo utilizado no experimento. A Figura 5 ilustra um dos géis após revelação da RT-PCR realizada nesta fase.

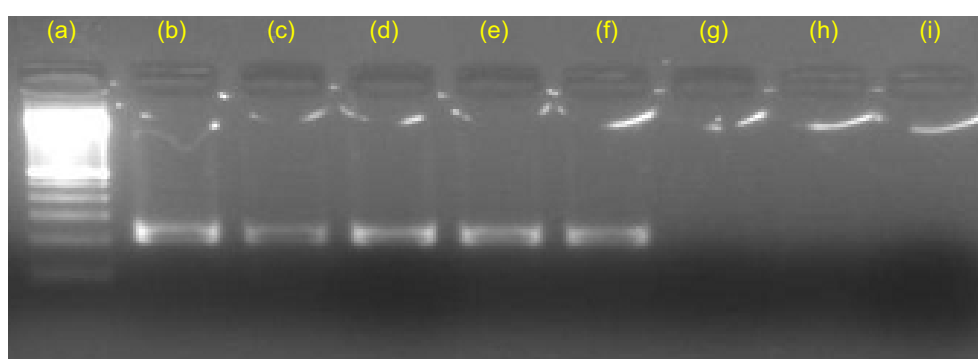


Figura 5: Gel de agarose 2,0% evidenciando (a) marcador de peso molecular *Ladder* 100pb (LGB Biotecnologia); resultados da RT-PCR depois da incubação com o vírus por (b) 8h, (c) 16h, (d) 32h, (e) 40h, (f) 48h; (g) controle negativo da reação de RT-PCR; (h) controle negativo das plaquetas (incubadas com soro negativo); (i) controle negativo do tubo utilizado no experimento (tubo vazio incubado com soro positivo para o VHC).

b) Metodologia para Extração de RNA

Para determinar a metodologia mais eficiente para extração de RNA das plaquetas após a incubação com o vírus, as amostras incubadas por 16 horas foram testadas repetidamente utilizando três metodologias de extração: *QIAamp RNA Blood Mini Kit* (QIAGEN, Valencia, CA, USA), *QIAamp Viral RNA Mini Kit* (QIAGEN, Valencia, CA, USA) e, *QIAamp Viral RNA Mini Kit* precedido de uma etapa de lise com o tampão *RLT* (QIAGEN, Valencia, CA, USA). Nesta fase, observou-se que as amostras extraídas com o *QIAamp RNA Blood Mini Kit* e o *QIAamp Viral RNA Mini Kit* eram RT-PCR negativas para o vírus. No entanto, as mesmas amostras quando extraídas com *QIAamp Viral RNA Mini Kit* precedido de uma etapa de lise com o tampão *RLT* apresentaram-se RT-PCR positivas para o vírus, evidenciando

maior sensibilidade deste método de extração para o experimento proposto. A partir deste resultado, todas as demais extrações de RNA de plaquetas foram realizadas com o *QIAamp Viral RNA Mini Kit* precedido de uma etapa de lise com o tampão *RLT*.

O *QIAamp RNA Blood Mini Kit* é um protocolo utilizado para extração de RNA de amostras de sangue e fluidos contendo células. Após uma etapa inicial de lise de eritrócitos, os leucócitos são coletados por centrifugação e lisados, utilizando um tampão de lise (*RLT*), o qual também inativa RNases. No passo seguinte, ocorre a extração do RNA pela adsorção em uma coluna contendo uma membrana de sílica-gel, a qual permite etapas de lavagens e, posterior eluição do RNA em solução de baixa molaridade. Já o *QIAamp Viral RNA Mini Kit* consiste em um protocolo específico para extração de RNA de plasma, soro e fluidos isentos de células. Inicialmente utiliza-se um tampão (*AVL*) que inativa as RNases e um carreador de RNA. Em seguida a extração de RNA se processa por sua adsorção em uma coluna de sílica-gel e, após sucessivas lavagens ocorre a eluição do RNA. O uso do carreador permite um maior rendimento, uma vez que geralmente fluidos isentos de células podem possuir menor quantidade de RNA quando comparados ao conteúdo celular (QIAGEN, 1999).

A extração de RNA das plaquetas diretamente com o *QIAamp Viral RNA Mini Kit* pode ter sido ineficaz devido a ausência de um tratamento para lise da membrana da plaqueta, o que ocorreu quando se utilizou o *QIAamp RNA Blood Mini Kit*. No entanto, quando se utilizou um tampão de lise (*RLT*) a extração do RNA utilizando o *QIAamp Viral RNA Mini Kit* foi mais eficiente provavelmente pela existência de um carreador de RNA que elevou o rendimento da extração, considerando a quantidade de RNA presente.

2-RT-PCR para detecção do RNA do VHC nos doadores

Amostras de plasma dos 50 doadores cujas plaquetas foram incluídas neste estudo foram submetidas a RT-PCR para detecção do RNA do VHC. Todas as 50 amostras apresentaram RT-PCR negativa para o RNA

do vírus evidenciada pela ausência de amplificação da região 5'UTR. Em todas as reações foram realizados controles negativo e positivo. A Figura 6 ilustra uma das reações de RT-PCR realizadas.

Apesar da ampla variabilidade genética do genoma do VHC (ROSEN; GRETCH, 1999), as regiões que flanqueiam o genoma, não codificadoras 5'UTR e 3'UTR são altamente conservadas (PENIN et al., 2004) tornando-as imprescindíveis para que ocorra a replicação viral (BUSTIN 2000, 2002; DREXLER et al., 2009). Desta forma, para a detecção da presença do RNA viral é estratégica a utilização de uma destas regiões como alvo (OKAMOTO et al., 1990).

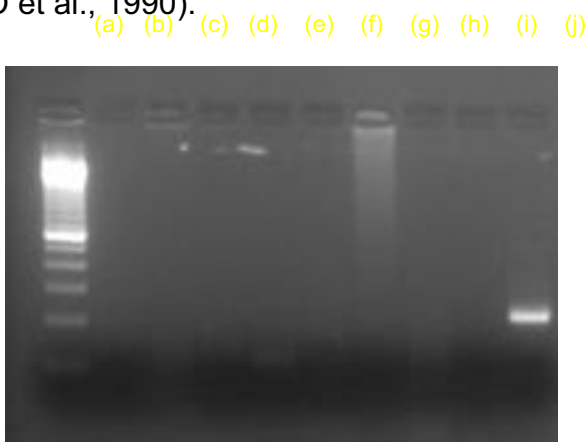


Figura 6: Gel de agarose 2,0% evidenciando (a) marcador de peso molecular *Ladder* 100pb (LGB Biotecnologia); (b), (c), (d), (e), (f), (g) e (h) resultados da RT-PCR de 07 doadores de plaquetas confirmando a negatividade para o VHC antes da incubação com o vírus; (i) controle negativo da reação de RT-PCR; (j) controle positivo da reação.

3-Análise Qualitativa da presença do RNA do VHC em plaquetas incubadas com o vírus

Todas as amostras de plaquetas provenientes dos 50 doadores voluntários foram RT-PCR positivas para o RNA do VHC após a incubação com o vírus, sugerindo que o vírus possa apresentar algum tipo de interação com as plaquetas *in vitro*. Os controles do experimento (controles negativos) e da RT-PCR validam os resultados obtidos. A Figura 7 ilustra um dos resultados da RT-PCR obtidos após incubação.

(a) (b) (c) (d) (e) (f) (g) (h) (i) (j) (k) (l) (m) (n) (o) (p) (q) (r) (s) (t)

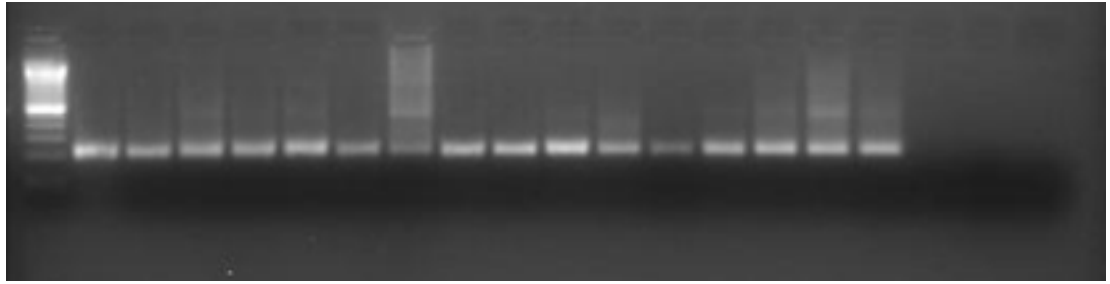


Figura 7: Gel de agarose 2,0% evidenciando (a) marcador de peso molecular *Ladder* 100pb (LGB Biotecnologia); (b), (c), (d), (e), (f), (g), (h), (i), (j), (k), (l), (m), (n), (o), (p) e (q) resultados da RT-PCR das plaquetas após incubação com o vírus; (r) controle negativo da reação de RT-PCR; (s) controle negativo das plaquetas (incubadas com soro negativo); (t) controle negativo do tubo utilizado no experimento (tubo vazio incubado com soro positivo para o VHC).

Durante o experimento foram confeccionadas lâminas do material após os procedimentos de lavagem das plaquetas, as quais foram coradas com *Leishman*. A figura 8 ilustra a observação exclusiva de plaquetas no material do estudo, evidenciando que o único material oferecido para o vírus durante a incubação foi plaqueta.

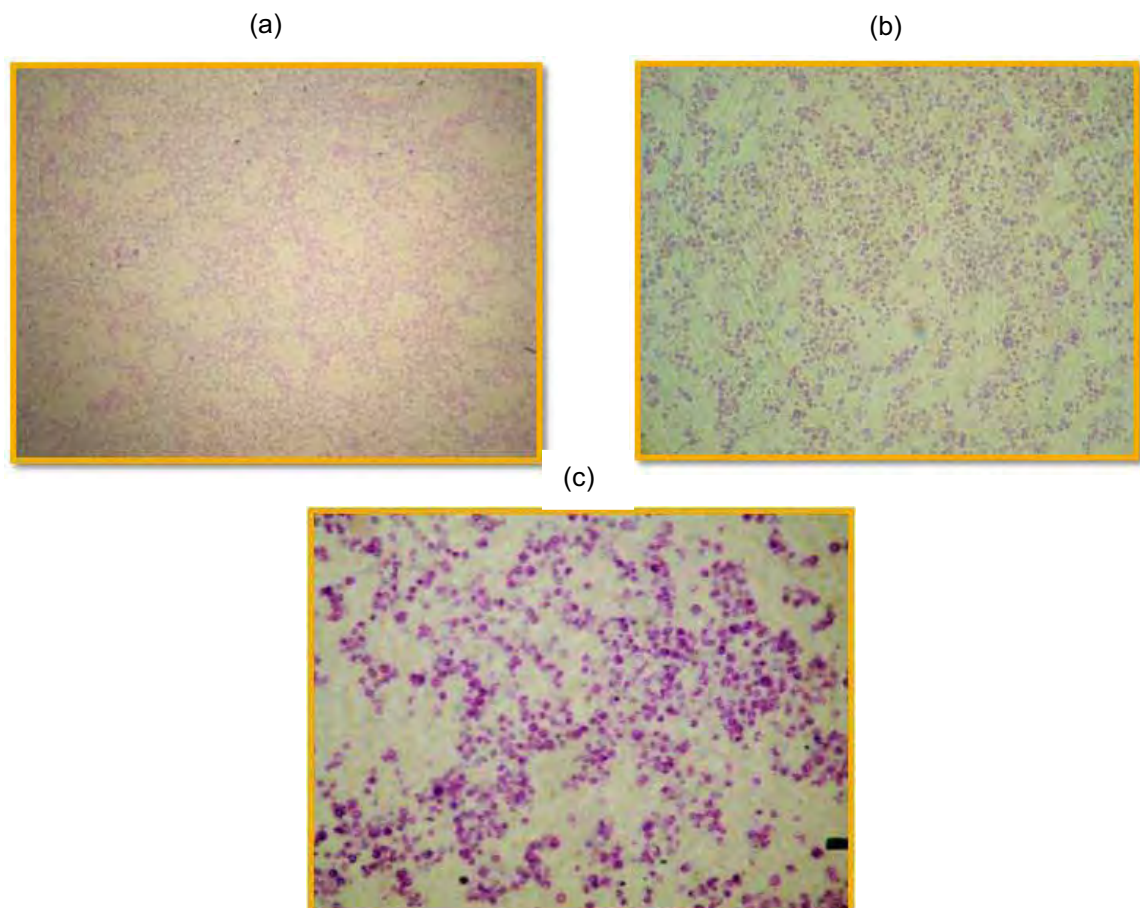


Figura 8: Fotos de uma das lâminas coradas com *Leishman*, confeccionada durante o experimento, evidenciando a presença exclusiva de plaquetas, (a) objetiva de 40X, (b) objetiva de 50X, (c) objetiva de 100X.

Embora já esteja bem documentado que a célula alvo do VHC é o hepatócito, RNA viral já foi encontrado em plaquetas (HERNANDEZ et al., 1998). A entrada do vírus no hepatócito é mediada por receptores expressos na célula (BURLONE; BUDKOWSKA, 2009), e várias moléculas vêm sendo associadas a este processo (PILERI et al., 1998; AGNELLO et al., 1999; SCARSELLI et al., 2002; CORMIER et al., 2004; EVANS et al., 2007; BURLONE; BUDKOWSKA, 2009).

O primeiro receptor associado à entrada do vírus em hepatócitos foi o CD81, proteína expressa na superfície celular de algumas células a qual fisiologicamente, está envolvida em vários processos celulares como diferenciação, adesão, maturação celular e gametogênese. No entanto, apesar desta proteína ser expressa na superfície de várias células, inclusive hepatócitos (PILERI et al., 1998; SHOHAM, et al., 2006) e megacariócitos (MA et al., 2001), não está presente em macrófagos, granulócitos e plaquetas (ROIT, BROSTOFF et al., 2000).

O CD81 possui quatro domínios transmembrânicos formados por três alças extracelulares e um domínio terminal intracelular. (HEMLER, 2003; LEVY; SHOHAM, 2005). Esta proteína de superfície celular foi associada com a entrada no VHC nos hepatócitos, pela ligação de uma das alças transmembrânicas do CD81 com a glicoproteína do envelope viral E2 (PILERI et al., 1998). No entanto, acredita-se que somente o CD81 não poderia promover a entrada do vírus nas células e, assim outros co-receptores podem ser necessários para a internalização do vírus. Entre as moléculas já propostas para desempenhar esta função estão os receptores de lipoproteína

de baixa densidade (LDL) (AGNELLO et al., 1999) e o SR-BI (receptor *scavenger* tipo B classe I) (SCARSELLI et al., 2002).

No entanto, outros autores mostram que a função do CD81 seria de co-receptor para a internalização viral e não receptor primário. (VON HAHN et al., 2006), devendo existir outras moléculas, também, envolvidas na entrada do VHC nas células (DUBUISSON et al., 2008).

O receptor *scavenger* tipo B classe I (SR-BI) é uma proteína expressa em várias células de mamíferos, principalmente no fígado e tecidos esteroideogênicos. Apresenta dois domínios citoplasmáticos, dois domínios transmembrânicos e uma grande alça extracelular com nove sítios potenciais de glicosilação. (ACTON et al., 1994; RHAINDS; BRISSETTE, 2004). Sua função está relacionada com a ligação a uma proteína de superfície celular, responsável pela captação seletiva de éster de colesterol transportada pelas lipoproteínas de alta densidade (HDL) (RIGOTTI et al., 1997; KOZARSKY et al., 1997). É um receptor usado em diversas classes de lipoproteínas, como: de alta densidade (HDL), baixa densidade (LDL) e densidade muito baixa de lipoproteínas (VLDL), bem como para as lipoproteínas modificadas quimicamente, como as acetiladas e oxidadas. (REHERMANN; NASCIMBENI, 2005)

A associação do VHC com lipoproteínas de baixa densidade (LDL) ou de muito baixa densidade (VLDL) parece favorecer a entrada deste vírus pela SR-BI. (WÜNSCHMANN et al., 2000; BARTOSCH et al., 2003).

Em 2007 Evans e colaboradores associaram uma proteína de adesão celular, membro da família das claudulinas com a entrada do VHC, a claudulina 1 (CLDN 1). Esta proteína é expressa em todos os tecidos epiteliais, principalmente no fígado (FURUSE et al., 1998). A molécula é composta de 211 aminoácidos, apresentando duas alças extracelulares, quatro segmentos transmembrânicos e três domínios intracelulares (VAN ITALLIE; ANDERSON, 2006). Na primeira alça protéica extracelular existe um domínio altamente conservado, o qual parece estar envolvido na entrada de VHC (EVANS et al., 2007).

Dois outros membros desta família protéica, CLDN6 e CLDN9 podem, também, estar envolvidos no processo de entrada do VHC (ZHENG et al., 2007; MEERTENS et al., 2006). Estas claudulinas são expressas no fígado e nas células mononucleares do sangue periférico (ZHENG et al., 2007).

Da maneira semelhante às claudulinas, outra proteína envolvida na adesão celular, a ocludina vem sendo associada à entrada do VHC nas células (LIU et al., 2009).

A ocludina é uma proteína integral de membrana de 60kDa, com 150 aminoácidos divididos em quatro domínios transmembrânicos, três citoplasmáticos e duas alças extracelulares. Localizada nas zônulas de oclusão (*tight junctions*) de células endoteliais e epiteliais (FURUSE et al., 1993), a ocludina é um componente essencial desta zônula, participando tanto da adesão entre células e destas no espaço paracelular quanto na ancoragem da junção ao citoesqueleto (PENG et al., 2003).

Outras moléculas biológicas vêm sendo relacionadas à entrada do VHC como as glicosaminoglicanas, cadeias lineares de polissacarídeos expressas em diferentes tipos celulares (BARTH et al., 2003; GERMI et al., 2002). Existem alguns estudos sugerindo que o VHC se liga à glicosaminoglicanas no início da infecção (FLINT et al., 2001).

Uma glicosaminoglicana encontrada nos hepatócitos é o sulfato de heparan (SH), o qual foi associado à infecção pelo VHC (KROSCHEWSKI et al., 2003). A ligação do VHC com o Sulfato de Heparan pode ter um papel essencial nos primeiros passos da infecção pelo vírus, entretanto o papel exato das glicosaminoglicanas na entrada da célula do VHC permanece desconhecido (CALLENS et al., 2005).

Desta forma, nota-se que várias moléculas estão envolvidas na entrada do vírus nos hepatócitos e, algumas delas são proteínas envolvidas na adesão celular. No mesmo sentido, a entrada de outros tipos de vírus também foi associada a moléculas de adesão célula-célula ou célula-matriz

extracelular (GREVE et al., 1989; STAUNTON, 1989), incluindo algumas integrinas (BERGELSON et al., 1992; WICKHAM et al., 1993).

As integrinas são receptores transmembrana de proteínas da matriz extracelular e de superfície de células que conectam a matriz ao citoesqueleto celular, desempenhando, desta forma, um papel importante na adesão, migração celular, montagem de matriz de fibronectina, transdução de sinais, diferenciação, desenvolvimento embrionário, resposta imunológicas, manutenção da estrutura celular, cicatrização de ferimentos e metástase tumoral. (BROWN; YAMADA, 1995; PARCK et al., 2000; MURAMATSU et al., 2004).

As integrinas são glicoproteínas heterodiméricas transmembranas, constituídas por duas subunidades, uma alfa (α) e outra beta (β) associadas não covalentemente entre si (DIPERSIO et al., 1997). Possuem uma seqüência arginina – glicina - ácido aspártico (Arg-Gly-Asp), também conhecido como sítio universal de reconhecimento (RGD), de vital importância para sua função (HAUBNER, FINSINGER, KESSLER, 1997; ARNAOUT, GOODMAN et al., 2002; XIONG et al., 2002).

Embora a plaqueta não expresse em sua membrana a molécula CD81, este marcador já foi encontrado em células precursoras da plaqueta, os megacariócitos (MA et al., 2001) e até o momento, não era conhecido se a interação com o VHC poderia ocorrer diretamente com as plaquetas em sangue periférico ou com os megacariócitos na medula óssea. No entanto, os resultados obtidos neste estudo demonstram que, *in vitro*, o VHC interage com as plaquetas e, devido à ausência do CD81, pode ser que exista alguma outra molécula na superfície plaquetária relacionada a esta interação.

No contexto geral da interação entre célula hospedeira e alguns vírus nota-se que as integrinas podem ser fortes candidatas a se relacionarem a esta interação. As plaquetas expressam em sua membrana algumas glicoproteínas da família das integrinas, como os complexos protéicos GPIa-IIa, GPIc-IIa, GPIc'-IIa e GPIIb-IIIa, os quais podem estar relacionados a interação do VHC com plaquetas.

A glicoproteína GPIIb-IIIa atua como receptor de colágeno, estando envolvida na agregação plaquetária (WATSON; GIBBINS, 1998). Sua deficiência ou a presença de anticorpos dirigidos contra a GPIIb-IIIa resulta na deficiência da hemostasia (KUNICKI et al., 1993). A GP IIb-IIIa é abundante na superfície plaquetária e, atua como receptor na interação entre plaquetas ou na ligação das plaquetas com proteínas do subendotélio vascular, sendo fundamental para o processo de agregação e adesão (CHARO; KIEFFER; PHILLIPS, 1994). Do ponto de vista imunológico, existem alguns antígenos plaquetários que residem nestas duas glicoproteínas da família das integrinas, os antígenos plaquetários humanos (HPA) dos sistemas HPA -1, -3, -4 e -5 (Figura 4) (METCALFE, 1999) e, dessa forma poderiam estar relacionados com o processo de interação do VHC com plaquetas.

4-Análise Quantitativa do RNA do VHC em plaquetas com diferentes perfis HPA incubadas com o vírus

Este estudo avaliou os sistemas HPA -1, -3 e -5, uma vez que o HPA -4 apresenta raras ocorrências do alelo b na população (SHIBATA et al., 1986a; SHIBATA et al., 1986b., TORALLES-PEREIRA et al., 2005)

O HPA -1a difere do -1b pela substituição de um único nucleotídeo contendo uma timina por uma citosina na posição 196, conduzindo ao aparecimento de uma prolina no códon 33 da proteína, que estaria ocupado por uma leucina (Tabela 1) (NEWMAN et al., 1989).

No sistema -3, o HPA-3a difere do 3b a troca de um aminoácido no códon 843, no qual isoleucina é substituída por uma serina, resultante da substituição de uma guanina por uma citosina na posição 2622 da cadeia de nucleotídeos (Tabela 1) (LYMAN et al., 1990).

No sistema -5 o polimorfismo na posição 1648 na cadeia de DNA, no qual uma guanina é substituída por uma adenina, conduz a presença de uma lisina (HPA -5b) no códon 505 ao invés de uma glutamina (HPA -5a) (Tabela 1) (SANTOSO et al., 1993).

Os antígenos HPA já foram associados a doenças relacionadas à adesão, ativação e agregação plaquetária. A pesquisa de fatores que afetam

as proteínas plaquetárias inclui modificações genéticas que podem alterar a expressão da proteína na superfície da membrana ou a ativação dela e, dessa forma, influenciar o processo hemostático (CAVANAGH et al., 2003).

No mesmo sentido, as funções das integrinas parecem ser dependentes de alterações conformacionais em sua molécula. Diferentes modelos estruturais sugerem que modificações nas subunidades (α e β) da integrina podem se relacionar com alteração na função (CALVETE, 1999).

Recentemente, um estudo demonstrou um aumento na frequência alélica do HPA -5b em indivíduos infectados pelo vírus quando comparados com a população não infectada (VERDICHIO-MORAES et al., 2009).

Os resultados iniciais encontrados no presente estudo sugerem que o VHC interage com plaquetas *in vitro* e, devido à ausência do CD81, outras moléculas poderiam estar envolvidas com essa interação. As integrinas da membrana plaquetária, onde residem alguns HPA, poderiam ter alguma participação nessa interação.

Seguindo essa hipótese, foi investigado se após incubação das plaquetas provenientes de doadores sadios com o VHC, existiriam diferenças quantitativas no que se refere às cargas virais, na dependência do perfil HPA das plaquetas.

A Tabela 4 mostra os resultados obtidos nesta fase do estudo quando se determinou a carga viral nas 50 amostras de plaquetas com diferentes perfis HPAs após incubação com o vírus.

Tabela 4: Classificação das 50 amostras de plaquetas de acordo com o perfil HPA e a carga viral obtida a partir do RNA do VHC extraído após incubação com o vírus.

Perfil HPA	Carga Viral (UI/mL)		
	Inferior a 1000	Superior a 1.000	Total
HPA 1a/1a 3a/3a 5a/5a	8	7	15
HPA 1a/1b ou 1b/1b 3a/3a 5a/5a	5	2	7
HPA 1a/1a 3a/3b ou 3b/3b 5a/5a	4	7	11
HPA 1a/1a 3a/3a 5a/5b	3	3	6
Outros perfis HPA	7	4	11
Total	27	23	50

Quando foi realizada a análise estatística considerando-se o perfil HPA completo e a carga viral, nenhuma diferença significativa foi encontrada ($\chi^2= 2,686$; $p\text{-value}=0,6117$). Desta forma, novas análises foram realizadas considerando-se apenas carga viral detectável ou indetectável. A tabela 5 mostra os resultados obtidos com esta análise.

Tabela 5: Classificação das 50 amostras de plaquetas de acordo com o perfil HPA e a detecção da presença do RNA do VHC extraído após incubação com o vírus por RT-PCR em tempo real

Perfil HPA	Carga Viral (UI/mL)		
	Indetectável*	Detectável	Total
HPA 1a/1a 3a/3a 5a/5a	6	9	15
HPA 1a/1b ou 1b/1b 3a/3a 5a/5a	4	3	7
HPA 1a/1a 3a/3b ou 3b/3b 5a/5a	1	10	11
HPA 1a/1a 3a/3a 5a/5b	1	5	6
Outros perfis HPA	6	5	11
Total	18	32	50

*Indetectável: inferior a 18,4 UI/mL

Mesmo com esta nova abordagem não houve diferenças significativas ($\chi^2= 7,535$; $p\text{-value}=0,1102$).

Desta forma, novas análises foram realizadas considerando a frequência genotípica e alélica independentes dos três sistemas HPA estudados (Tabela 6).

Tabela 6: Frequências alélica e genotípica dos sistemas HPA -1, -3 e -5 de acordo com a detecção da presença do RNA do VHC extraído de plaquetas após incubação com o vírus por RT-PCR em tempo real (n=50), $p<0.05$

Genótipos	Carga Viral (UI/mL)			χ^2	$p\text{-Value}$
	Indetectável*	Detectável			
HPA 1a/1a	09	24	5,387	0,0676	
HPA 1a/1b	07	08			
HPA 1b/1b	02	0			
HPA 3a/3a	12	17	1,314	0,5183	
HPA 3a/3b	03	10			
HPA 3b/3b	03	05			
HPA 5a/5a	14	26	0,08681	0,7683	
HPA 5a/5b	04	06			
HPA 5b/5b	0	0			
Alélos	Indetectável*	Detectável	χ^2	$p\text{-Value}$	
HPA 1a	25 [#]	56 [#]	4,881	0,0272	
HPA 1b	11 [#]	08 [#]			
HPA 3a	27	44			
HPA 3b	09	20	0,4371	0,5085	

HPA 5a	32	58		
HPA 5b	04	06	0,07716	0,7812

*Indetectável: inferior a 18,4 UI/mL #Diferença significativa entre carga viral indetectável e detectável

Os resultados apresentados na tabela 6 mostram que, embora nenhuma diferença significativa tenha sido encontrada pela análise da frequência genotípica, quando se considerou a frequência alélica diferença estatisticamente significativa para o sistema HPA-1 foi encontrada.

Os resultados mostram um desvio no equilíbrio de *Hard-Weinberg* no sistema HPA-1. A frequência alélica do HPA -1b foi significativamente menor ($p < 0,05$) quando se analisou as plaquetas que apresentavam carga viral detectável pela metodologia de RT-PCR em tempo real utilizada. Desta forma, considerando o limite de detecção da técnica 18,4 UI/mL, os resultados mostram que a presença do alelo b favoreceu níveis muito baixos de carga viral.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados aqui apresentados mostraram que o VHC é capaz de interagir com plaquetas e, devido à ausência do receptor celular CD81, outras proteínas podem estar envolvidas nesta interação como, as integrinas. Quando esta hipótese foi avaliada, os resultados mostraram que existia menor frequência do alelo HPA -1b em plaquetas com carga viral superior a 18,4 UI/mL.

No entanto, para inferir sobre o significado destes achados novos estudos devem ser realizados. Os resultados apresentados foram obtidos por experimentos *in vitro* e, portanto, é necessário investigar até que ponto estes achados podem ser extrapolados para o paciente infectado pelo vírus.

Além disso, se a mesma observação for encontrada *in vivo*, estudos devem ser realizados no sentido de determinar se a presença do alelo HPA -1b é mais freqüente em pacientes que clareiam o vírus, em pacientes que apresentam melhor resposta virológica sustentada, em pacientes com menores graus de fibrose hepática, de forma a determinar se o achado aqui apresentado constitui apenas um marcador molecular de prognóstico ou, está envolvido na fisiopatologia da doença.

REFERÊNCIAS

ACTON, S. L. et al. Expression cloning of SR-BI, a CD36-related class B scavenger receptor. *J. Biol. Chem.*, v.269, n.33, p.21003-21009, 1994.

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

AMORIM, R.M.S.; OLIVEIRA C.P.; WYANT P.S.; et al. Hepatitis C virus genotypes in blood donors from the Federal District, Central Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v.99, n.8, p.895-897, 2004.

ARNAOUT, M. A.; GOODMAN, S. L.; XIONG, J.-P. Coming to grips with integrin binding to ligands. *Curr. Opin. Cell Biol.*, v.14, n.5, p.641-652, 2002.

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.

BARTH, H.; C. et al. Cellular binding of hepatitis C virus envelope glycoprotein E2 requires cell surface heparan sulfate. *J. Biol. Chem.*, v.278, n.42, p.41003–41012, 2003.

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

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

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

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

BRANDÃO, A. B. M. et al. Diagnóstico da hepatite C na prática médica: revisão da literatura. *Rev. Panam. Salud Publica*, v.9, n.3, p.161-168, 2001.

Brasil. *Brasil: 2,4 milhões têm hepatite C sem saber*. Brasília, 2009.
Disponível em
<http://www.sistemas.aids.gov.br/imprensa/Noticias.asp?NOTCod=55149>
acesso em 25/04/2009.

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.

BUSTIN, A.S. Absolut quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J. Mol. Endocrinol.*, v.25, n.2, p.169-193, 2000.

BUSTIN, A.S. Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. *J. Mol. Endocrinol.*, v.29, n.1, p.23-39, 2002.

BROWN, K.E.; YAMADA, K.M. The role of integrins during vertebrate development. *Semin. Dev. Biol.*, v.6, n.2, p.69-77, 1995.

CALLENS, N. et al. Basic residues in hypervariable region 1 of hepatitis C virus envelope glycoprotein E2 contribute to virus entry. *J. Virol.*, v.79, n.24, p.15331–15341, 2005.

CALVETE, J.J. Platelet integrin GPIIb/IIIa: Structure-Function correlations. An update and lessons from other integrins. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, v. 222, p.29-38, 1999.

CAVANAGH, G. et al. HPA genotyping by PCR sequence-specific priming (PCR-SSP): a streamlined method for rapid routine investigations. *Transfus. Med.*, v.7, n.1, p.41-45, 2003.

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.

COELHO, H.S. M.; SOARES, J.A.S.; MELLO, C.E.B. *Hepatites*. Rio de Janeiro: Rubio, 2006.cap. 2, p.11.

CONTE V.P. Hepatite Crônica por Vírus C. *Arq. Gastroenterol.*, v.37, n.3, p. 187-193, 2000.

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.

CORROA, G ; ARICOO, S. Independent and combined action of hepatitis C virus infection and consumption on the risk of symptomatic liver-cirrhosis. *Hepatology*, v.27, n.4, p.914- 919, 1998.

CHARO, I. F.; KIEFFER, N.; PHILLIPS, D. R. Platelet membrane glycoproteins. In: COLMAN, W. et al. (Eds.). – *Hemostasis and Thrombosis: basic principles and clinical practice*. 3. ed. Philadelphia:Lippincott Company., 1994 p.489-507.

DREXLER, J.F. et al. A novel diagnostic target in the hepatitis C virus genome. *PLoS Med.*, v.6, n.2, p.e1000031.

DI PERSIO, C.M. et al. $\alpha 3\beta 1$ integrin is required for normal development of the epidermal basement membrane. *J. Cell. Biol.*, v.137, n.3, p.729–742, 1997.

DROSTEN, C. et al. Ultrasensitive Monitoring of HIV-1 Viral Load by a Low-Cost Real-Time Reverse Transcription-PCR Assay with Internal Control for the 5' Long Terminal Repeat Domain. *Clinical Chemistry*, v.52, n.7, p.1258–1266, 2006.

DUBUISSON, J.; HELLE, F.; COCQUEREL, L. Early steps of hepatitis C virus life cycle. *Cell. Microbiol.*, v.10, n.4, p. 821–827, 2008.

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

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.

FARCI, P.;PURCELL, R.H. Clinical significance of hepatitis C virus genotypes and *quasispecies*. *Semin. Liver. Dis.*, v.20, n.1, p.103- 126, 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.

FATTOVICH, G. et al. Effectiveness of interferon-alfa on incidence of hepatocellular carcinoma and descompensation in cirrhosis type C. *J. Hepatol.*, v.27, n.1, p.201-205, 1997.

FURUSE, M. et al. Claudin-1 and -2: novel integral membrane proteins localizing at tight junctions with no sequence similarity to occludin. *J. Cell. Biol.*, v.141, n.7, p.1539–1550, 1998a.

FURUSE, M. et al. Occludin: a novel integral membrane protein localizing at tight junctions. *J. Cell. Biol.*, v.123, p.1777–1788, 1993.

GARSON, J. A. et al. Enhanced detection by PCR of hepatitis C virus RNA. *The Lancet*, v.336, n.8719, p.878-879, 1990.

GERMI, R.; CRANCE, J.-M.; GARIN, D. Cellular glycosaminoglycans and low density lipoprotein receptor are involved in hepatitis C virus adsorption. *J. Med. Virol.*, v.68, n.2, p.206–215, 2002.

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

HAMAIA, S.; LI, C.; ALLAIN, J.P. The dynamics of hepatitis C virus binding to platelets and 2 mononuclear cell lines. *Blood*, v.98, n.8, p.2293-2300, 2000.

HAUBNER, R.; FINSINGER, D.; KESSLER, H. Stereoisomeric peptide libraries and peptidomimetics for designing selective inhibitors of the $\alpha 3$ integrin for a new cancer therapy. *Angew. Chem. Int. Ed. Eng.*, v.36, n.13-14, p.1374-1389, 1997.

HEMLER, M.E. Tetraspanin proteins mediate cellular penetration, invasion, and fusion events and define a novel type of membrane microdomain. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.*, v.19, p.397-422, 2003.

HNATYSZYN H.J. Chronic hepatitis C and genotyping: the clinical significance of determining HCV genotypes. *Antivir. Ther.*, v.10, n.1, p.1-11, 2005.

HERNANDEZ, M.E. et al. Risk of needle-stick injuries in the transmission of hepatitis C virus in hospital personnel. *J. Hepatology*, v.16, n.1-2, p.56-58, 1992.

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

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

HONDINKA, R.L. Laboratory diagnosis of viral hepatitis. In: SPECTER, S. (Ed.). *Viral hepatitis*. Totowa: Humana, 1999. p.206-212.

ITALIANO, J.E.; HARTWIG, J.H. Megakaryocyte development and platelet formation. In: MICHELSON, A. D. *Platelets*. California: Academic Press, 2002. p. 21-35.

JUNGKIND, D. Automation of laboratory testing for infectious diseases using the polymerase chain reaction – our past, our present, our future. *J. Clin. Virol.* v.20, p.1-6, 2001.

KALB, R. et al. Localization of the Br polymorphism on a 144bp exon of the GPIa gene and its application for platelet DNA typing. *Tromb. Haemost.*, v.71, n.5, p.651-654, 1994.

KIEFEL, V. et al. The Bra/Brb alloantigen system on human platelets. *Blood*, v.73, n.8, p.2219-2223, 1989.

KROSCHEWSKI, H. et al. Role of heparan sulfate for attachment and entry of tick-borne encephalitis virus. *Virology*, v.308, n.1, p.92–100, 2003.

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

KOZARSKY, K. F. et al. Overexpression of the HDL receptor SR-BI alters plasma HDL and bile cholesterol levels. *Nature*, v.387, p.414–417, 1997.

KUNICKI, T. J. et al. Variability of integrin $\alpha 2 \beta 1$ activity on human platelets. *Blood*, v.82, n.9, p.2693-2703, 1993.

KUIJPERS, R. W. et al. NH₂-terminal globular domain of human platelet glycoprotein Iba has methionine 145/ threonine 145 amino acid polymorphism, which is associated with the HPA-2 (Ko) alloantigens. *J. Clin. Invest.*, v. 89, n.2, p.381-384, 1992.

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

LEVY, S.; SHOHAM, T. Protein-protein interactions in the tetraspanin web. *Physiology (Bethesda)*, v.20, n.4, p.218–224, 2005.

LYMAN, S.; ASTER, R.H.; NEWMAN, P.J. Polymorphism of human platelet membrane glycoprotein IIb associated with the Baka/Bakb alloantigen system. *Blood*, v.75, n.12, p.2343-2348, 1990.

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

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

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

LUCAS, G.F.; METCALFE, P. Platelet and granulocyte polymorphisms. *Transfus. Med.*, v.10, n.3, p.157-174, 2000.

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

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

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. Sao Paulo*, v.48, n.1, p. 53-55, 2006.

MEERTENS, L.; BEARTAU, C.; DRAGIC, T. Hepatitis C virus entry requires a critical postinternalization step and delivery to early endosomes via clathrin-coated vesicles. *J. Viro.*, v.80, n.23, p.11571–11578, 2006.

METCALFE, P. et al. Human platelet antigen-2 and -3 genotyping by PCR-SSP. *Transfus. Med.*, v.5, n.4, p.285-288, 1995.

METCALFE, P. et al. HPA genotyping by PCR-SSP: report of 4 exercises. *Vox Sang.*, v.77, n.1, p.40-43, 1999.

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

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

MURAMATSU, H. et al. $\alpha 4\beta 1$ - and $\alpha 6\beta 1$ - integrins are functional receptors for midkine, a heparin-binding growth factor. *J. Cell. Sci.*, v.117, p.5405-5415, 2004.

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.

NEWMAN, P.J., DERBES, R.S., ASTER, R.H. The human platelet alloantigens, PIA1 and PIA2, are associated with a Leucine33/ Proline33 amino acid polymorphism in membrane glycoprotein IIIa, and are distinguishable by DNA typing. *J. Clin. Invest.*, v.83, n.5, p.1778-1781, 1989.

OKAMOTO, H. et al. The 5'-terminal sequence of the hepatitis C virus genome. *Jap. J. Exp. Med.*, v.60, n.3, p.167-177, 1990.

PARCK, C.C.; BISSEL, M.J.; BARCELLOS-HOFF, M.H. The influence of the microenvironment on the malignant phenotype. *Mol. Med. Today*, v.6, n.8, p.324-329, 2000.

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.

PECK-RADOSAVLJEVIC, M. Trombocytopenia in liver disease. *Can. J. Gastroenterol.*, v.14, p.60-66, 2000.

PENG, B.H., LEE, J.C.; CAMPBELL, G.A. *In vitro* protein complex formation with cytoskeleton-anchoring domain of occludin identified by limited proteolysis. *J. Biol. Chem.*, v.278, n.49, p.49644–49651, 2003.

PENIN, F. et al. Structural biology of hepatitis C virus. *Hepatology*, 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.

QUIAGEN. QIAamp® Viral RNA Mini Kit Handbook, 1999.

RHAINDS, D.; BRISSETTE, L. The role of scavenger receptor class B type I (SR-BI) in lipid trafficking: defining the rules for lipid traders. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, v.36, n.1 p.39–77, 2004.

REHERMAN, B.; NASCIMBENI, M. Immunology of hepatitis B virus and Hepatitis C virus infection. *Nat. Rev. Immunol.*, v.5, 215-229, 2005.

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

RIGOTTI, A. et al. A targeted mutation in the murine gene encoding the high density lipoprotein (HDL) receptor scavenger receptor class B type I reveals its key role in HDL metabolism. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v.94, n.23, p.12610–12615, 1997.

ROBERTSON, B.; MYERS, G.; HOWARD, C. et.al. Classification, nomenclature, and database development for hepatitis C virus (HCV) and

related viruses: proposals for standardization. International Committee on Virus Taxonomy. *Arch. Virol.*, v.143, n.12, p.2493-2503, 1998.

ROIT, I.; BROSTOFF, J.; MEIL, D. *Immunology*, Moscow: Mir, 2000.

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

RUGGERI, Z. M. Mechanisms initiating platelet thrombus formation. *Thromb. Haemost.*, v.78, n.1, p.611-616, 1997.

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

SANDRES-SAUNÉ, K. et al. Determining hepatitis C genotype by analyzing the sequence of the NS5b region. *J. Virol. Meth.*, v.109, n.2, p.187-193, 2003.

SANTOSO, S; KIEFEL, V. Human platelet-specific alloantigens: update. *Vox Sang.*, v.74, n. 2, p.249-253, 1998.

SANTOSO, S. et al. The human platelet alloantigens Bra and Brb are associated with a single amino acid polymorphism on glycoprotein Ia (Integrin subunit $\alpha 2$). *J. Clin. Invest.*, v.92, n.5, p.2427–2432, 1993.

SANGUINETTI, C.J.; DIAS-NETO, E.; SIMPSON, A.J.G. Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels. *Biotechniques*, v.17, n.5, p.915-919, 1994.

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.

SHIBATA, Y.; MIYAJI, T.; ICHIKAWA, Y. A new platelet antigen system, Yuk^a/Yuk^b. *Vox Sang.*, v.51, n.4, p.334–336, 1986a.

SHIBATA, Y. et al. Yuk^a, a new platelet antigen involved in two cases of Neonatal Alloimmune Thrombocytopenia. *Vox Sang.*, v.50, n.3, p.177–180, 1986b.

SCHROEDER, M.L; RAYNER, H.L. Red cell, platelet and white cell antigens. In: LEE, G.R. et al. *Wintrobe's clinical hematology*.9.ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1993. p.616-650. v.1,cap.20.

SCOTT, J.D.; GRETCH D.R. Molecular Diagnosis of hepatitis C virus. *J. Am. Med. Assoc.*, v.297, n.7, p.724-732, 2007.

SHOHAM, T. et al. Building of the tetraspanin web: distinct structural domains of CD81 function in different cellular compartments. *Mol. Cell. Biol.*, v.26, n.4, p.1373–1385, 2006.

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

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

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

SIMMONDS, P. et al. Consensus Proposals for a United System of Nomenclature of Hepatitis C Virus Genotypes. *Hepatology*, v.42, n.4, p.962-973, 2005.

SJOBRING, U.; RINGDAHL, U.; RUGGERI, Z. M. Induction of platelet thrombi by bacteria and antibodies. *Blood* , v.100, n.13, p.4470–4477, 2002.

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

TONG, M. J. et al. Clinical outcomes after transfusion associated hepatitis C. *N.Engl. J.Med.*, v.332, n.22, p.1463-1466, 1995.

TORALLES-PEREIRA, C. et al. The first report of the human platelet alloantigen 4b allele in a Brazilian. *Int.J.Immunogen.*, v.32, n.3, p.165-166, 2005 Jun.

TORALLES, C.T. **O polimorfismo dos antígenos plaquetários**. 2001. 132f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2001.

VERDICCHIO-MORAES, C. F; TORALLES-PEREIRA, C; GROTTTO R. M. T. et al. Allelic frequencies of HPA-1 to -5 human platelet antigens in hepatitis C virus-infected patients. *J. Med. Virol.*, v.81, p.757-759, 2009.

VAN ITALLIE, C. M.; ANDERSON,J. M. Claudins and epithelial paracellular transport. *Annu. Rev. Physiol.*, v.68, p.403–429, 2006.

VON HAHN, T. et al. Oxidized Low-Density Lipoprotein inhibits hepatitis C virus cell entry in human hepatoma cells. *Hepatology*, v.43, n.5, p.932-942, 2006.

XIONG, J. P. et al. Crystal structure of the extracellular segment of integrin $\alpha V\beta 3$ *Science*, v.294, n.5541, p.339-345, 2001.

ZAAIJER, H.L. et al. Reliability of polymerase chain reaction for detection of hepatitis C virus. *Lancet*, v.341, n.8847, p.722-724, 1993.

ZEIN, N. N. et al. Hepatitis C virus genotypes in the United States: Epidemiology, pathogenicity and response to interferon therapy. Collaborative study group. *Ann. Intern.Med.*, v.125, n.8, p.634-639, 1996.

ZEIN, N. N. Clinical significance of hepatitis C virus genotypes. *Clin. Microbiol. Rev.*, v.13, n.2, p.223-235, 2000.

ZHENG, A. et al. Claudin-6 and Claudin-9 function as additional coreceptors for hepatitis C virus. *J. Virol.*, v.81, n.22, p.12465–12471, 2007.

WANG, R. et al. An amino acid polymorphism within the RGD binding domain of platelet membrane glycoprotein IIIa is responsible for the formation of the Pena/Penb alloantigen system. *J. Clin. Invest.*, v.90, n.5, p. 2038-2043, 1992.

WATSON, S. P.; GIBBINS, J. Collagen receptor signalling in platelets: extending the role of the ITAM. *Immunol. Today*, v.19, n.6, p.260–264, 1998.

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

WÜNSCHMANN, S. et al. Characterization of hepatitis C virus (HCV) and HCV E2 interactions with CD81 and the low-density lipoprotein receptor. *J. Virol.*, v.74, n.21, p. 10055-10062, 2000.