



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

Gabriela Boni Poli

**Avaliação da carga viral do Vírus da Hepatite B em
plasma pobre em plaquetas**

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

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

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

Botucatu

2020

Gabriela Boni Poli

Avaliação da carga viral do Vírus da Hepatite B em
plasma pobre em plaquetas

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

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

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

Botucatu

2020

FICHA CATALOGRAFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÊC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU UNESP
BIBLIOTECA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE – 8/5651

Poli, Gabriela Boni.

Avaliação da carga viral do vírus da Hepatite B em plasma pobre em plaquetas/
Gabriela Boni Poli
Botucatu, 2020

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”,
Faculdade de Medicina de Botucatu.

Orientador: Maria Inês de Moura Campos Pardini.

Coorientador: Rejane Maria Tommasini Grotto.

Capes:33004064079P5

1- Hepatite B. 2-Carga viral. 3- hepatite por virus. 4-Plasma pobre em
plaquetas.

Palavras-chave: Hepatite B; Carga viral; Compartimento biológico; Plaquetas; Plasma
rico em plaquetas; Plasma pobre em plaquetas; Beads magnéticas; Coluna de sílica

Dedico este trabalho aos meus pais por serem meu ponto de segurança e sempre me incentivarem a ir em busca de meus sonhos.

A vocês meu eterno amor

Dedico em especial as Professoras Rejane e Maria Inês que de uma maneira única transmitem aos seus alunos não apenas conhecimentos científicos, mas também conhecimentos sobre a vida. A importância e a dedicação de vocês diante de seus alunos é o que as tornam seres de muita luz.

As senhoras minha eterna gratidão

Agradeço primeiramente a **Deus** por caminhar ao meu lado todos os dias, a **Santa Catarina de Alexandria** auxiliadora dos estudantes, **Santa Rita de Cassia** e meus **Guias** por cuidar, iluminar e guiar todos os meus passos.

Aos meus pais **Antonio** e **Celia** agradeço imensamente por todo amor e dedicação, por serem luz em minha vida, por sempre me apoiarem e me ensinarem a ser uma pessoa melhor a cada dia. Por serem exemplo de bondade e amor, por serem meu pôr do sol de cada manhã. Obrigada por todos os ensinamentos, conselhos, por me ensinarem a caminhar sozinha, por lutarem junto comigo por meus sonhos, por chorarem e sorrirem pelas minhas vitórias e por me ensinarem a nunca desistir.

Aos meus irmãos **Andria**, **Douglas** e **Eduardo** agradeço por sempre dividir minutos preciosos comigo. Obrigada por serem meus anjos guardiões, por estarem ao meu lado sempre, obrigada por cada sorriso, conselho e obrigada por simplesmente existirem. Com vocês eu cresci, eu aprendi, eu vivi intensamente feliz da vida por saber que juntos dividimos sorrisos vindo do coração.

“Nossos irmãos são os nossos melhores amigos são as pessoas com que dividimos cada minuto, cada segredo, cada lágrima e cada sorriso, são nossos amigos de infância pessoas que nos apoiam, que nos fortalecem, são anjos sem asas e que não podem voar, porém são anjos de luz que iluminam cada dia de sua vida”

Amo Grandão

A minha Avó **Alneide**, um ser de coração puro e bondoso agradeço por sempre torcer, rezar e vibrar por minhas conquistas. Aos meus tios **Célia** e **Sebastião** e minhas madrinhas **Conceição** e **Priscila** agradeço por toda dedicação e carinho, por estarem ao meu lado comemorando, chorando e sempre brindando por cada minuto de felicidade, obrigada por todos os conselhos, por todo apoio e acima de tudo por todo amor.

Aos meus **Amigos/Irmãos** obrigada por todos os minutos de alegria, obrigada por me ouvirem estudar, por aguentarem meu mau humor e meu estresse, obrigada por cada oração feita de mãos dadas, obrigada por cada admiração a lua e vendo a ela brilhar que meus olhos se enchem de lágrimas ao agradecer todo carinho e amor de vocês, agradeço a Deus pela benção de ter anjos que me guiam e torcem por mim,

obrigadas por cada madrugada em claro esperando o sol nascer apenas para apreciar a beleza da natureza juntos, cada minuto ao lado de vocês é guardado em meu coração Amo por demais cada um de vocês. Que Deus continue abençoar a nossas amizades, que cada dia ela se fortaleça mais e mais. Obrigada por cada abraço de dois braços.

“Amigos, pra sempre bons amigos que nasceram pela fé. Amigos, pra sempre sim, se Deus quiser”

Aos meus amigos de casa **Ana Livia e Lucas** agradeço por todos os dias de conversas, as cantorias que nos anima, pelas madrugadas em claro estudando, pela parceria nas ideias malucas, obrigada acima de tudo por todos os sorrisos e abraços. Agradeço por todos os conselhos e apoio. A presença de vocês em meus dias é preciosa.

Aos meus amigos do Laboratório e do hemocentro **Regina, Maercio, Ritinha, Erica, Leonardo, Fabiana, Driele, Flavia, Lia, Natalia, Renata, Luiza, Cristiane, Franciele, Caroline, Larissa, Lucas e Heloysa** agradeço imensamente todos os dias por dividirmos momentos de conhecimentos, conselhos, puxões de orelha, comilança e de alegria. Com vocês aprendi muitas coisas e ainda aprendo. Mas o melhor é o companheirismo que temos agradeço por tudo que dividimos e agradeço a presença e colaboração de cada um de vocês não apenas para a realização deste trabalho, mas por todos dias de sorriso, parcerias e ouvintes.

Cada um de vocês tem um lugar especial em meu coração Que Deus abençoe a cada um de vocês e permita que a nossa amizade permaneça iluminada

“Feliz aquele que possui amigos de verdade, irmão para toda a vida terá”

A minha Orientadora **Drª Maria Inês** e minha Co-orientadora **Drª Rejane** Agradeço por todas as oportunidades de conhecimentos, crescimento profissional e pessoal. Obrigada pela confiança e toda ajuda na execução deste trabalho.

Desde o aprimoramento venho agregando cada vez mais conhecimentos e hoje agradeço por serem mais que professoras, agradeço por serem amigas e por

dividirem além de conhecimentos, dividirem sorrisos e conselhos. Agradeço todo o carinho, dedicação, paciência e preocupações.

“Feliz aquele que transferi o que sabe e que aprende o que ensina” *Cora Carolina*

Resumo

O vírus da hepatite B (HBV) tem se destacado como um dos mais relevantes, especialmente pela sua alta transmissibilidade, capacidade de evolução da infecção para a forma crônica e a mortalidade por doenças hepáticas associadas ao vírus. Estima-se que em todo mundo existam em torno de 2 bilhões de indivíduos infectados pelo HBV, 257 milhões de portadores crônicos, 4 milhões de novos casos sintomáticos e entre 600 mil a 1 milhão de óbitos anuais por complicações hepáticas associadas à hepatite B. A prevalência tem sido reduzida em países onde a vacinação foi implantada, porém permanece alta em populações de risco e em países onde a transmissão vertical e horizontal não é controlada, o que torna a hepatite B crônica um relevante problema de saúde pública. Atualmente para o diagnóstico do HBV são empregados teste sorológico imunoensaios e testes rápidos, para a detecção dos constituintes do vírus e teste moleculares para determinar a carga viral sendo um componente crucial na avaliação de pacientes com infecção crônica por HBV e na avaliação da eficácia do tratamento antiviral. Atualmente o teste molecular utiliza amostras de soro ou plasma de pacientes portadores de infecção crônica por HBV. No entanto alguns estudos têm demonstrado a presença de vírus como HBV, HCV e HIV em outros compartimentos biológicos, preservando a permanência do vírus dentro do organismo. A pesquisa pela presença do vírus em outros compartimentos se faz necessária em busca de detectar as possíveis vias de reativação do vírus. A hipótese deste trabalho é que o HBV também interaja com plaquetas dos pacientes, de modo que amostra com plasma rico em plaquetas apresente uma carga viral maior quando comparado com amostra pobre em plaquetas. O objetivo do presente trabalho foi avaliar a carga viral do HBV no plasma pobre em plaquetas comparativamente a carga viral no plasma rico em plaquetas. Os experimentos desenvolvidos foram realizados em duas etapas: Etapa1 padronização e Validação dos procedimentos de separação do plasma e obtenção dos plasmas rico em plaqueta e do plasma pobre em plaquetas. A Etapa 2 Comparação da carga viral do HBV no plasma rico e pobre em plaquetas utilizando a metodologia *Abbott RealTime HBV assay* (Abbott Molecular, Des Moines, USA). Segundo especificações do fabricante variações nos resultados de carga viral da mesma amostra não devem ser significativos e, o método utilizado é validado para

utilização em plasma ou soro. No entanto, os nossos resultados demonstram uma diferença significativa entre a carga viral de plasma rico e pobre em plaquetas, sugerindo que a metodologia de extração de DNA viral por *Beads* não seja a mais adequada para esse tipo de amostra. Possivelmente contaminantes presentes no plasma e/ou plaquetas interfiram na interação entre DNA e *Beads*. Realizamos o mesmo experimento utilizando kit de extração baseado em coluna de sílica e não observamos diferença na carga viral entre plasma rico e pobre em plaquetas. Concluimos que a extração de DNA por *Beads* pode sofrer interferência de outras moléculas presentes no plasma/soro podendo interferir na real carga viral do paciente. Diante dos nossos achados, propomos que a extração de DNA por coluna de sílica seja uma possível alternativa à extração por *Beads*.

Palavras-chave: Hepatite B; Carga viral; Compartimento biológico; Plaquetas; Plasma rico em plaquetas; Plasma pobre em plaquetas; Beads magnéticas; Coluna de sílica.

Abstract

The hepatitis B virus (HBV) has stood out as one of the most relevant, especially for its high transmissibility, the ability of the infection to evolve to a chronic form and mortality due to liver diseases associated with the virus. It is estimated that worldwide there are around 2 billion individuals infected with HBV, 257 million chronic carriers, 4 million new symptomatic cases and between 600,000 to 1 million deaths annually from liver complications associated with hepatitis B. The prevalence has been reduced in countries where vaccination has been implemented, but remains high in populations at risk and in countries where vertical and horizontal transmission is not controlled, which makes chronic hepatitis B a relevant public health problem. Currently, for the diagnosis of HBV, serological tests, rapid tests and immunoassays are used to detect virus constituents and molecular tests to determine viral load, being a crucial component in the evaluation of patients with chronic HBV infection and in the evaluation of the effectiveness of the antiviral treatment. Currently, the molecular test uses serum or plasma samples from patients with chronic HBV infection. However, some studies have demonstrated the presence of viruses such as HBV, HCV and HIV in other biological compartments, preserving the virus's permanency inside the body. The search for the presence of the virus in other compartments is necessary in order to detect possible reactivation routes the virus. The hypothesis of this study is that HBV also interacts with patients' platelets, so that a sample with a platelet-rich plasma has a higher viral load when compared to a platelet poor sample. The aim of the present study was to evaluate the HBV viral load in platelet-poor plasma compared to the viral load in platelet-rich plasma. The developed experiments were carried out in two stages: Stage 1 standardization and Validation of the procedures for separating the plasma and obtaining platelet-rich plasma and platelet-poor plasma. Step 2: Comparison of HBV viral load in platelet rich and low plasma using the Abbott RealTime HBV assay methodology (Abbott Molecular, Des Moines, USA). According to the manufacturer's specifications, variations in the viral load results of the same sample should not be significant and the method used is validated for use in plasma

or sérum. However, our results demonstrate a significant difference between the viral load of platelet-rich and platelet-poor plasma, suggesting that the methodology for extracting viral DNA by Beads is not the most appropriate for this type of sample. Possibly contaminants present in the plasma and / or platelets interfere with the interaction between DNA and Beads. We performed the same experiment using an extraction kit based on a silica column and we did not observe a difference in viral load between platelet-rich and platelet-poor plasma. We conclude that the extraction of DNA by Beads may suffer interference from other molecules present in the plasma / serum and may interfere with the patient's real viral load. In view of our findings, we propose that DNA extraction by silica column is a possible alternative to extraction by Beads.

Keywords: Hepatitis B; Viral load; Biological compartment; Platelets; Platelet-rich plasma; Platelet-poor plasma; Magnetic Beads; Silica column.

Lista de Figuras

Figura 1 - Representação esquemática da estrutura e proteínas do vírus da hepatite B.....	21
Figura 2 - Representação esquemática do genoma do HBV.....	22
Figura 3 - Representação esquemática do ciclo de vida do HBV.....	24
Figura 4 - Curso dos marcadores sorológicos da infecção aguda da Hepatite B.....	26
Figura 5 - Curso dos marcadores sorológicos da infecção crônica da Hepatite B.....	28
Figura 6 - Procedimento esquemático para purificação de ácidos nucleicos pela tecnologia de esferas magnéticas.....	29
Figura 7 - Representação da interação de vírus com os receptores expressos na superfície da plaqueta.....	31
Figura 8 – Representação esquemática da Padronização e Validação dos procedimentos de separação do plasma e obtenção dos plasmas rico (PRP) e pobre (PPP) em plaquetas.	35
Figura 9 – Representação esquemática do esfregaço de plasma da padronização e validação dos procedimentos de separação do plasma e obtenção dos plasmas rico (PRP) e pobre (PPP) em plaquetas.	36
Figura 10 – Representação esquemática da obtenção e quantificação dos plasmas pobre (PPP) e rico (PRP) em plaquetas.....	37
Figura 11 - Representação esquemática da quantificação dos plasmas pobre (PPP) e rico (PRP) em plaquetas.	38
Figura 12 - Exemplo de três resultados obtidos no esfregaço de plasma depois da centrifugação do sangue total Contador automático-Pentra Nexus dx- Corador SPS Evolution, sendo as imagens obtidas quando o sangue total foi separado por diferentes rotações (a) 1356xg por 10 minutos; (b) 1176xg por 3 minutos; (c) 1300xg por 5 minutos. As setas pretas indicam uma das plaquetas observadas em cada campo.....	41

Lista de Tabelas

Tabela 1: Concentração de plaquetas a partir da obtenção do plasma separado por: (a) centrifugação do sangue total à 1356xg por 10 minutos; (b) centrifugação do sangue total à 1176xg por 3 minutos; (c) centrifugação do sangue total à 1300xg por 5 minutos.....40

Tabela 2 - Resultados para a quantificação do DNA do HBV (carga viral) no plasma pobre em plaquetas (PPP) e no plasma rico em plaquetas (PRP).....42

Tabela 3: Resultados para a quantificação do DNA do HBV (carga viral) nos quatro grupos avaliados.....47

Tabela 4: Resultados para a quantificação do DNA do HBV (carga viral) no plasma pobre em plaquetas (PPP) e no plasma rico em plaquetas (PRP).....48

Lista de Gráficos

Gráfico 1: Carga viral do plasma pobre em plaquetas (PPP) e do plasma rico em plaquetas (PRP), $p=0,0004$ (Teste de <i>Wilcoxon</i>).....	43
Gráfico 2: Logaritmo decimal da carga viral no plasma pobre em plaquetas (PPP) e no plasma rico em plaquetas (PRP), $p=0,0210$, teste <i>T de Student</i>	44
Gráfico 3: Logaritmo decimal da carga viral do plasma pobre em plaquetas (PPP) e do plasma rico em plaquetas (PRP), $p=0,2108$ (Teste de <i>T de Student</i>).....	49

Lista de Abreviações e Siglas

HBV – Vírus da Hepatite B

OMS – Organização mundial da saúde

SINAN – Sistema de informação de agravos e notificação

AgHBs – Antígeno de superfície da Hepatite B

AgHBe – Antígeno do envelope da Hepatite b

AgHBc – Antígeno do nucleocapsídeo da Hepatite B

ANTIHBs – Anticorpo contra antígeno de superfície da Hepatite B

ANTIHBc - Anticorpo contra antígeno nuclear da Hepatite B

ANTIHBc – Anticorpo contra o nucleocapsídeo da Hepatite B

CHC – Carcinoma Hepatocelular

LHBS – Proteína S grande da Hepatite B

MHBS – Proteína S média da Hepatite B

SHBS – Proteína s pequena da Hepatite B

PB – Pares de base

DR – Direct Repeats

ORF – Open Reading Frame

DNA – Ácido desoxirribonucleico

RcDNA – Ácido desoxirribonucleico circular relaxado

cccDNA - Ácido desoxirribonucleico circular covalente fechado

RNA - Ácido Ribonucleico

PgRNA – Ácido Ribonucleico pré genômico

mRNA – Ácido Ribonucleico mensageiro

TR – Teste Rápido

MS – Ministério da saúde

PCR – Reação em cadeia da polimerase

VEs – Vesículas extracelulares

TRL – Receptores de tool like

CMV - Citomegalovírus

EBV - Vírus Epstein Barr

HIV – Vírus da Imunodeficiência adquirida

HCV – Vírus da Hepatite C

DV – Vírus da Dengue

PRP – Plasma Rico em Plaquetas

PPP – Plasma Pobre em Plaquetas

PBS - Phosphate Buffered Saline

EDTA - Ácido etilenodiamino tetra-acético

hNTCP - -Peptídeo co-transportador de tourocolato de sódio humano

HSPGs - Heparan-sulfate proteoglycans

NAT – Teste de Ácido Nucleico

Sumário

1 - Introdução.....	18
1.1-Prevalencia da infecção pelo do vírus da hepatite B	18
2 - Levantamento teórico.....	21
2.1- Características do HBV	21
2.2- Ciclo de replicação do HBV	23
2.3- Diagnóstico.....	25
3-Objetivo.....	33
4-Material e métodos.....	34
Etapa 1: Padronização e Validação dos procedimentos de separação do plasma e obtenção dos plasmas rico (PRP) e pobre (PPP) em plaquetas	34
Etapa 2: Comparação da carga viral do HBV no plasma rico em plaquetas e no plasma pobre em plaquetas.....	37
5 - Análise estatística.....	39
6 - Resultados e discussões	40
Etapa 1: Padronização e Validação dos procedimentos de separação do plasma e obtenção dos plasmas rico (PRP) e pobre (PPP) em plaquetas	40
Etapa 2: Comparação da carga viral do HBV no plasma rico em plaquetas e no plasma pobre em plaquetas.....	41
7 – Conclusões.....	50
8 - Referências Bibliográficas	51

1 - Introdução

1.1-Prevalência da infecção pelo vírus da hepatite B

O vírus da hepatite B (HBV) tem se destacado como um dos mais relevantes vírus, especialmente pela sua alta transmissibilidade, capacidade de evolução da infecção para a forma crônica e a mortalidade por doenças hepáticas associadas ao vírus. Estima-se que em todo mundo existam em torno de 2 bilhões de indivíduos infectados pelo HBV, 257 milhões de portadores crônicos, 4 milhões de novos casos sintomáticos e entre 600 mil a 1 milhão de óbitos anuais por complicações hepáticas associadas à hepatite B (RODRIGO; 2018)

A prevalência da hepatite B é mais alta na região do Pacífico Ocidental (6,2%) e na região africana (6,1%), na região mediterrânea oriental (3,3%), na região sudeste da Ásia (2,0%) e na região europeia (1,6%) da população geral estão infectados. Na região das Américas 0,7% da população está infectada com o vírus (OPAS;WHO, 2017).

No ano de 2015, em todo mundo, aproximadamente 887.000 pessoas morreram por doenças hepáticas graves decorrentes da infecção pelo HBV (WHO, 2017, 2018). No ano de 2016, a OMS, definiu como estratégia eliminar as hepatites virais. Apesar dos esforços, em 2016, 27 milhões de pessoas em todo mundo estavam infectadas com hepatite, sendo que dessas, 10,5% foram diagnosticadas com hepatite B e 4,5 milhões (16,7%) já estavam em tratamento. No ano de 2017, 1,1 milhões de pessoas foram infectadas com o vírus da hepatite B, e dessas, pelo menos 60% dos casos apresentavam câncer de fígado. Esses dados estão correlacionados com a baixa disponibilidade de testes para detecção do vírus, o que culmina em tratamento tardio da doença e avanço em sua disseminação. (RODRIGO; 2018)

No período de 1999 a 2018 foram notificados no Sistema de Informação de Agravos de Notificação (Sinan), 632.814 casos confirmados de hepatites virais no Brasil, destes 233.027 confirmados com o vírus da hepatite B (HBV) sendo a maioria concentrada na região sudeste com 34,09%, seguida das regiões Sul 31,6%, Norte 14,4%, Nordeste 9,9% e Centro Oeste 9,1% (BRASIL, 2018)

A prevalência tem sido reduzida em países onde a vacinação foi implantada, porém permanece alta em populações de risco e em países onde a transmissão vertical e horizontal não é controlada, o que torna a hepatite B crônica um relevante problema de saúde pública (BRASIL, 2018).

A transmissão pelo HBV pode ocorrer por via parenteral (compartilhamento de agulha, seringas, material de manicure e pedicure, lâminas de barbear, material para tatuagens e piercings, material de procedimento odontológico ou cirúrgico que não atendem as normas de biossegurança), por relação sexual desprotegida e por via vertical (materno-infantil). Além do sangue outros líquidos orgânicos como sêmen, secreção vaginal e leite materno também podem conter o vírus como fonte de infecção (BRASIL, 2017).

Esse problema é agravado visto que o vírus pode sobreviver até uma semana fora do corpo humano. No plasma, a vida média do HBV varia de um dia a três dias, enquanto nos hepatócitos a vida média varia de 10 dias-100 dias (FONSECA, 2007)

O vírus da hepatite B pode apresentar diversas manifestações clínicas, variando desde as formas assintomáticas, oligoassintomáticas e sintomáticas. Essas manifestações dependem dos fatores virais e do hospedeiro, sendo possível observar, as formas de infecção aguda ou crônica com período de incubação longo (SANTOS, 2019)

O curso da hepatite B aguda é caracterizado por período de Incubação que pode variar de um a seis meses após a exposição ao vírus e apresenta três fases: Prodrômica, icterica e convalescência. Na fase prodrômica o indivíduo infectado apresenta sinais inespecíficos como febre, fadiga, anorexia, náuseas e mialgia. Nesta fase há alterações das aminotransferases, elevação dos níveis de antígeno de superfície da hepatite B (AgHBs) e DNA do HBV detectável. Na fase de icterícia é de curta duração, pode ser precedida de colúria e nota-se uma redução da carga viral. Na fase de convalescência o quadro de icterícia é resolvido e ocorre a normalização das aminotransferases, diminuição do AgHBs, ausência de detecção do DNA do HBV no soro e soroconversão com a produção de anticorpo contra o antígeno de superfície da hepatite B (Anti-HBs).

Em adultos, 90% dos casos a doença é resolvida, ou seja, sem a evolução da doença. Nesse caso ocorre a eliminação completa do vírus ou a doença evolui para hepatite crônica, caracterizada pela persistência do AgHBs no soro. No entanto, 10% dos pacientes com hepatite aguda podem evoluir para a forma fulminante (SANTOS, 2019)

Os casos crônicos ocorrem em aproximadamente 5% a 10% dos indivíduos adultos infectados. Caso a infecção ocorra por transmissão vertical, o risco de evoluir para um quadro crônico em recém-nascidos de gestantes com evidências de replicação viral, AgHBs reagentes e HBV-DNA acima de 10⁴ UI/mL é de cerca de 70% a 90% e nos casos sem evidências de replicação viral é de 10% a 40% dos casos. Nos casos crônicos, a infecção pelo HBV, pode evoluir para carcinoma

hepatocelular (CHC) independente de da presença de cirrose hepática, como é observado em outras infecções virais, como a hepatite C (BRASIL, 2018)

De forma geral, a infecção crônica pelo HBV pode ser dividida em quatro fases: Imunotolerância; imunorreação; portador inativo e fase da reativação. Na fase da Imunotolerância ocorre elevada replicação viral, com tolerância do sistema imune e sem evidência de agressão hepatocelular (transaminases normais ou próximas do normal). Na fase de Imunorreação com o esgotamento da tolerância imunológica, ocorre agressão aos hepatócitos, nos quais ocorre a replicação viral, gerando elevação das transaminases. Na fase Portador inativo é caracterizada por níveis baixos ou indetectáveis de replicação viral, com normalização das transaminases e, habitualmente, soroconversão para anti-HBe (MINISTÉRIO DA SAÚDE DO BRASIL, 2018)

O escape viral pode ocorrer por integração do DNA viral ao genoma das células hospedeiras ou por depressão da atividade imunológica do hospedeiro, seja por meio de mutações virais, seja por tratar-se de pacientes imunodeprimidos. Em seguida ocorre a fase de reativação que pode ocorrer o retorno da replicação viral (MINISTÉRIO DA SAÚDE DO BRASIL, 2018)

Atualmente o vírus da hepatite B é classificado em nove genótipos, apresentam uma distribuição geográfica e étnica distinta. O genótipo A é prevalente no noroeste da Europa, América do Norte e África. Os genótipos B e C são comumente encontrados na Ásia. Os genótipos D demonstram uma distribuição mundial, mas predominam na região do mediterrâneo, incluindo o Oriente Médio e a Ásia Central. O genótipo E é encontrado na região oeste da África, enquanto o genótipo F está presente na população aborígene da América do Sul. O genótipo G foi isolado de portadores de HBV na Alemanha, França, Itália e Estados Unidos (Georgia) e o genótipo H foi confirmado na América Central. O genótipo I foi descrito na China, Vietnã e Laos. Recentemente, o décimo genótipo denominado genótipo J, foi isolado de um paciente de origem japonesa com CHC. No Brasil circulam em maior proporção os genótipos A, D e F (DE MELLO et al., 2014)

As evidências indicam que os genótipos e subgenótipos associados diferem nas características virológicas que podem estar relacionadas a diferenças na evolução clínica da doença hepática e na resposta ao tratamento (MELLO et al 2014). A infecção pelo vírus da Hepatite B (HBV) é marcada por uma evolução silenciosa, muitas vezes a doença é diagnosticada décadas após o contato. A principal forma clínica é a crônica, representando 72,5% dos casos. (BRASIL, 2018) Os casos agudos representam 15,8% e os fulminantes 2,0%. A longo prazo dependendo do grau e da intensidade da doença, pode evoluir para cirrose e/ou carcinoma hepatocelular (CHC) (LOPES; SCHINONI, 2011)

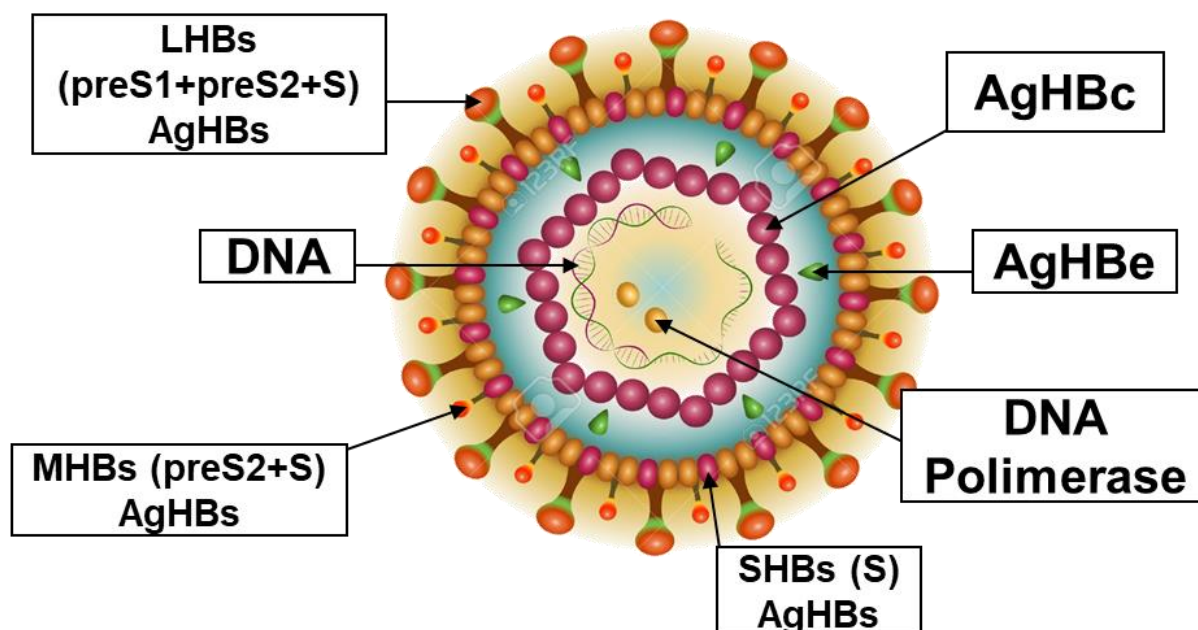
2 - Levantamento teórico

2.1- Características do HBV

O vírus da hepatite B pertence à família *Hepadnaviridae*, gênero *Orthohepadnavirus*. Todos os vírus dessa família são envelopados, tem um nucleocapsídeo no seu interior e possuem um DNA circular com uma fita dupla incompleta, o HBV apresenta em seu envelope o antígeno de superfície S (AgHBs) e internamente possui uma cápsula proteica, denominada core constituída pelo antígeno do core (AgHBc), sendo que este não é secretado para a corrente sanguínea e permanece mais abundante nos hepatócitos. (BLOCK; RAWAT; BROSGART, 2015; SANTOS, 2019)

No interior do core encontra-se a molécula de DNA viral, a proteína DNA polimerase (Proteína P) e o antígeno nuclear do HBV (AgHBe). O envelope lipídico externo do HBV é composto pelas proteínas S grande (LHBs) que contém os domínios preS1, preS2 e S; a proteína S média (MHBs) com os domínios preS2 e S, e por fim, a proteína S pequena (SHBs) que apresenta apenas o domínio S. (Figura 1) (BLOCK; RAWAT; BROSGART, 2015; SANTOS, 2019)

Figura 1 - Representação esquemática da estrutura e proteínas do vírus da hepatite B.



Fonte: adaptado de SANDLE, 2018

O genoma do HBV é constituído por DNA circular de fita parcialmente dupla com aproximadamente 3.200 pares de base (pb) (SEEGER; MASON, 2015). A fita mais longa é

A ORF P codifica a enzima central da replicação do genoma, a polimerase viral. Esta possui atividades de DNA polimerase, transcriptase reversa e atua como proteína terminal (DATTA et al., 2012). A ORF S codifica proteínas de superfície do envelope do vírus (LOPES; SCHINONI, 2011) antígeno de superfície grande, médio e pequeno (AgHBS) (DATTA et al., 2012). A ORF X codifica o (AgHBx) que parece estar envolvido nos processos de carcinogênese pela transativação de promotores celulares e virais (LOPES; SCHINONI, 2011).

A ORF C contém a região C e pré-C, essas regiões codificam duas RNA transcriptase: RNAm pré-genômico e o RNAm pré-core. O RNAm pré-genômico quando traduzido forma a proteína do (AgHBc), que está presente no core dos vírions em células hepáticas infectadas, mas que não é detectado no soro (LOPES, 2011). Além disso, o AgHBc está integrado ao genoma viral e a DNA polimerase, sendo essencial para a função de maturação do vírion. O RNAm pré-core é traduzido na proteína pré-core, que depois de processada é secretada como o antígeno e (AgHBe) presente no soro de paciente com replicação do HBV (LOPES; SCHINONI, 2011)

2.2- Ciclo de replicação do HBV

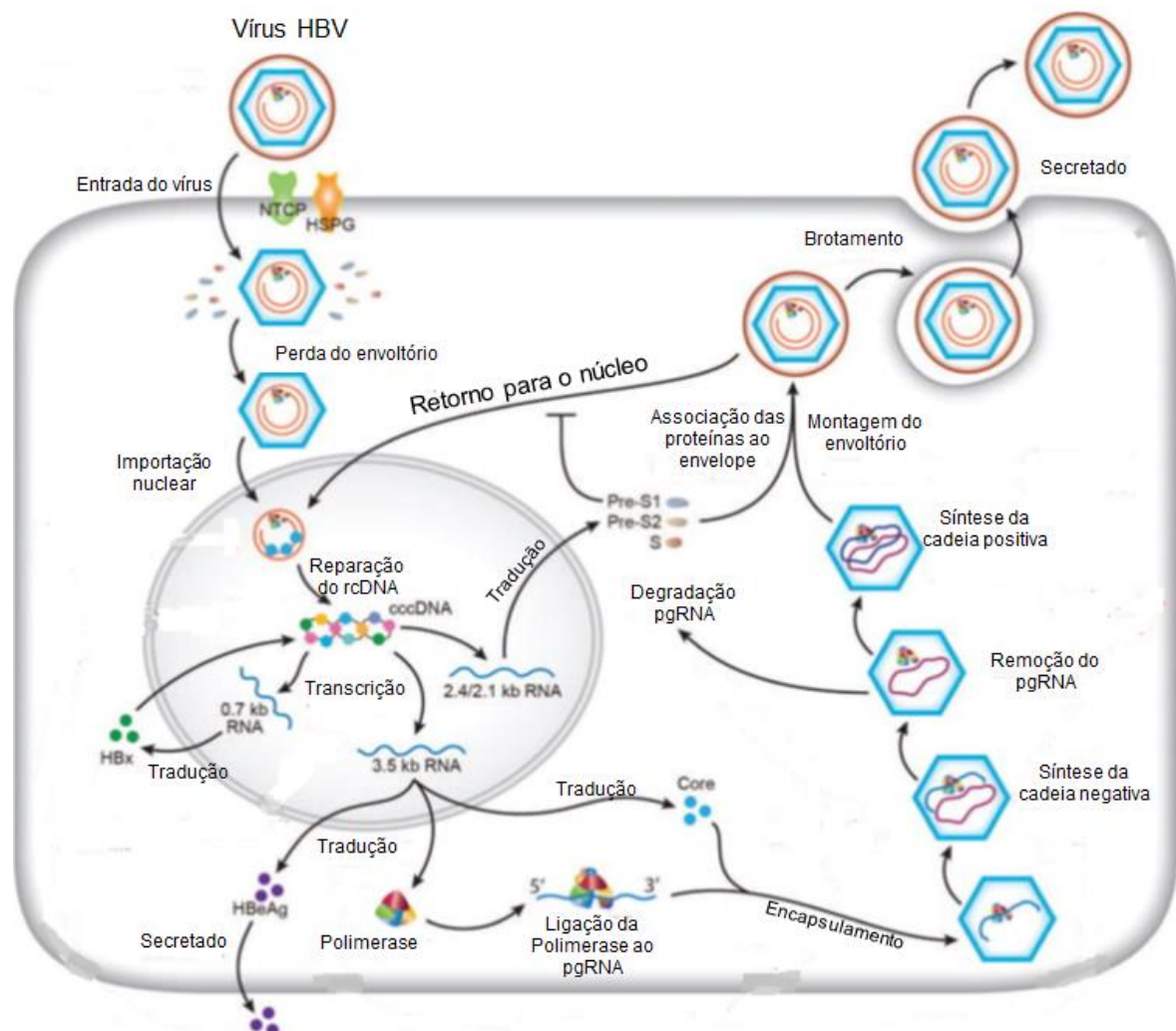
O vírus da hepatite B não é um vírus diretamente citopático, pois a evolução da doença dependerá da resposta imune do hospedeiro, pois tanto o componente celular quanto o humoral são necessários para a eliminação do vírus, principalmente a ação dos linfócitos T citotóxicos (CD8) dirigidos contra antígenos do core viral (BARROS JÚNIOR et al., 2008).

Estudos demonstram que a especificidade das espécies e a natureza hepatotrópica do HBV é devido a dois fatores celulares. O primeiro fator é a expressão específica para hepatócitos do receptor HBV recentemente descrito, peptídeo co-transportador de taurocolato de sódio humano (hNTCP), expresso apenas em hepatócitos humanos. O segundo nível de especificidade celular de uma infecção por HBV é controlada por fatores de transcrição específicos para hepatócitos como: HNF1 α e HNF4 α estes controlam os estágios posteriores a entrada do ciclo de vida do HBV (Figura 3) (LAMONTAGNE; BAGGA; BOUCHARD, 2016)

A entrada do vírus envelopado na célula é mediada por interações específicas de proteínas da membrana viral com receptores celulares. Inicialmente, a adsorção do vírion é mediada pela interação das proteínas do envelope com o receptor Proteoglicanos de Heparan-Sulfato (HSPGs) localizado no hepatócito, seguida da interação de alta-afinidade do domínio pré-S1 da proteína L com o receptor NTCP (NI et al., 2014)

Em seguida, o vírion penetra no citoplasma por endocitose mediada por clatrina (KANN, 2007; SANTOS, 2019). Uma vez na célula, o DNA do HBV é transportado ao núcleo pelo mecanismo de fosforilação da proteína central que expõem a localização nuclear, levando a desintegração do nucleocapsídeo e a transferência da forma circular relaxada (rc) do DNA do HBV ligada a polimerase. As lacunas da fita simples no rcDNA são reparadas pela extensão da fita pela polimerase do HBV formando o cccDNA (DNA circular covalente fechado). Alguns estudos sugerem que o cccDNA está ligado a proteína principal e ao HBx que isso influencia o arranjo estrutural cccDNA e a regulação epigenética (LAMONTAGNE; BAGGA; BOUCHARD, 2016)

Figura 3 - Representação esquemática do ciclo de vida do HBV



Fonte: adaptado de LIANG, 2015.

A molécula de cccDNA serve como modelo para a transcrição de todos os RNAs virais que fazem a síntese das proteínas e o RNA pré genômico (pgRNA), essencial para síntese do genoma viral. O pgRNA é transportado para o citoplasma, incorporado no núcleocapsídeo e convertido à cadeia negativa do DNA pela transcriptase reversa (OLIVEIRA, 2007). A polimerase viral tem três atividades funcionais: ativação, transcrição reversa e síntese do DNA viral para incorporação na próxima geração de virions da hepatite b (SEEGER; MASON, 2015).

O processo de ativação é iniciado a partir da síntese da fita negativa do DNA, a recém formada polimerase reconhece uma seção do pgRNA composta por uma alça tronco, onde uma molécula de trifosfato de desoxiguanosina torna-se covalentemente ligada e sofre pareamento por sua base com uma citosina dentro da alça tronco do RNA, duas moléculas de trifosfato de desoxiadenosina são adicionado a guanosina para formar uma curta sequência ativadora de DNA de três base, essa sequência ativadora é a chave para replicação do DNA viral sem ela não seria possível nenhuma síntese adicional do DNA (SEEGER; MASON, 2015).

Inicia-se então a etapa de transcrição reversa do RNA, sendo sintetizada a fita longa do DNA viral (5'→3') pela DNA polimerase viral (OLIVEIRA, 2007). A síntese do DNA viral continua até que o fim do molde do pgRNA seja copiado. O pgRNA é destruído e as progênies virais adquirem o envoltório, então os virions podem retornar ao núcleo celular para continuar o processo de replicação genômica ou pode ser secretados (OLIVEIRA, 2007)

A replicação do HBV ocorre no núcleo de um hepatócito infectado e o produto final da síntese de DNA é o rcDNA, encapsulado parcialmente de fita dupla. Este núcleocapsídeo pode então prosseguir de volta para o núcleo para amplificar e manter um pool estável de cccDNA que desempenha um papel importante na manutenção da persistência do HBV e que apresenta uma meia vida entre 33 e 57 dias ou seguir a via secretora envolta das proteínas de superfície do envelope viral a ser secretado da célula (LAMONTAGNE; BAGGA; BOUCHARD, 2016)

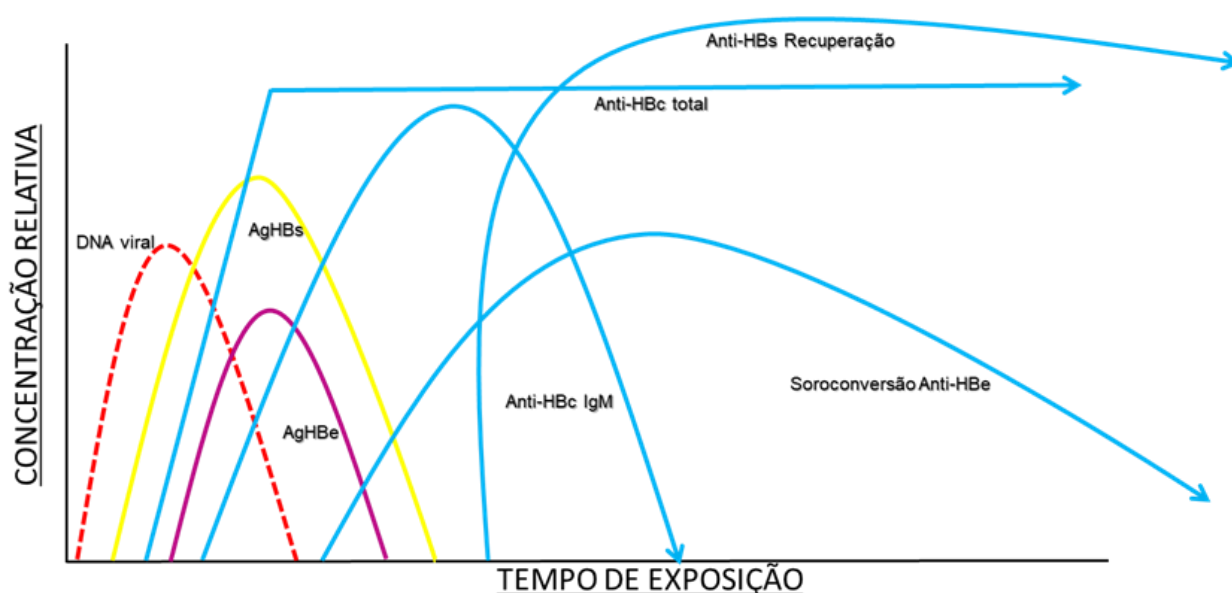
2.3- Diagnóstico

O diagnóstico laboratorial da hepatite B é realizado pela detecção dos constituintes do vírus, nas diferentes fases evolutivas da infecção utilizando testes sorológicos (pesquisas de antígenos e anticorpos). Atualmente são utilizados como diagnóstico sorológico os testes rápidos, e imunoensaio. Os testes rápidos (TR) são ensaios de execução simples e são empregados com uma estratégia para melhorar a triagem das hepatites virais. O ministério da saúde (MS) realiza a distribuição de testes

rápidos capazes de detectar o antígeno de superfície da hepatite b (AgHBs). Os imunoenaios são exames sorológicos para a detecção de anticorpo ou teste de detecção combinada de antígeno anticorpo contra o HBV (BRASIL, 2018)

O diagnóstico preciso e precoce da infecção pelo HBV permite o tratamento adequado da doença e tem impacto direto sobre a qualidade de vida do indivíduo, sendo ainda um poderoso instrumento de prevenção de complicações como cirrose e CHC (BRASIL, 2018). A fase de incubação do vírus dura em torno de 4 a 12 semanas e no final da incubação os primeiros marcadores e o DNA viral começam a ser detectados em níveis baixos (figura 4).

Figura 4- Curso dos marcadores sorológicos da infecção aguda da Hepatite B



Fonte: adaptado de MTHV, 2018.

Os títulos dos marcadores aumentam na fase aguda ou fase de replicação ativa sendo o mais elevado o AgHBs também conhecido como Antígeno Austrália, que aparece na corrente sanguínea de duas a seis semanas antes do início dos sintomas ou alteração das transaminases, mantendo-se detectável por até 20 semanas. Sendo um marcador presente tanto na fase aguda quanto na fase crônica. Pacientes que o mantem positivo por mais de seis meses provavelmente permanecerão como portadores ou desenvolverão hepatite crônica (SAÚDE, 2007).

O AgHBe é detectável na hepatite aguda, logo após o AgHBs. É uma proteína do nucleocapsídeo viral do HBV produzida durante a replicação ativa e sua presença está correlacionada com maior

quantidade do vírus no sangue, soro ou fluídos corporais. Quando associado ao AgHBs o risco de infectividade é cinco vezes maior. A persistência deste está associada a evolução da hepatite crônica (SAÚDE, 2007).

Durante a fase de replicação, títulos de anticorpos começam a aparecer, anti-HBe e Anti-HBc, o primeiro a aparecer é o Anti-HBe sendo detectado em 90 a 95% dos pacientes que foram AgHBe positivos, após duas a três semanas do desaparecimento do antígeno. Este é o primeiro sinal de recuperação e indica redução do risco de contágio (SAÚDE, 2007).

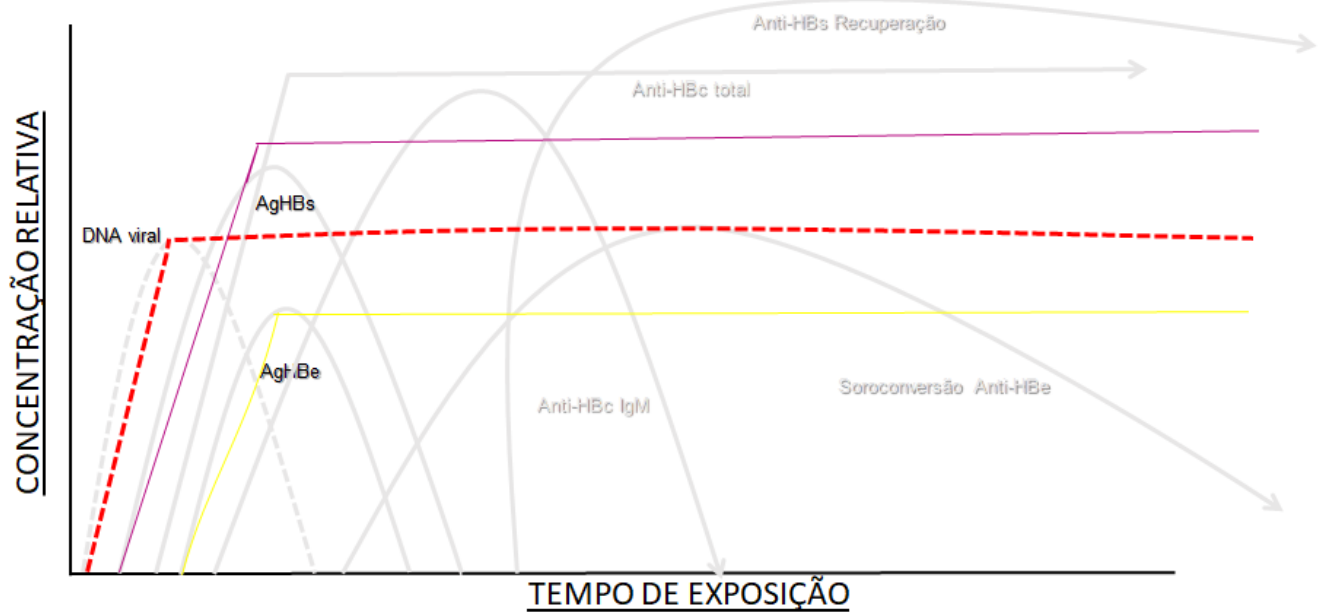
O anti-HBc refere-se a anticorpos produzidos contra antígenos do nucleocapsídeo, apresentando dois tipos: O anti-HBc IgM que se eleva concomitante as transaminases e declina gradualmente em 6 a 8 meses, sua presença indica infecção aguda ou recente E o anti-HBc IgG que surge em torno da oitava semana de infecção e persiste por toda vida (SAÚDE, 2007). O anti-HBc IgM é o melhor marcador sorológico para uma infecção aguda, enquanto o anti-HBc IgG representa memória imunológica (LOPES; SCHINONI, 2011)

Os anticorpos anti-HBs são neutralizantes e capazes de mediar imunidade preventiva, sendo induzidos pela vacinação. Os anticorpos anti-HBc e anti-HBs persistem por longos períodos no indivíduo, sendo que o anticorpo anti-HBs confere proteção contra o vírus (MINISTÉRIO DA SAÚDE DO BRASIL, 2018).

A interação entre a replicação viral e a resposta imune do hospedeiro determina o curso natural da infecção pelo vírus, uma vez que o HBV persiste em todos os pacientes com infecção, mesmo aqueles com evidências de recuperação sorológica (SUKRITI et al., 2019)

A cronificação da infecção é definida pela persistência do vírus, ou seja, pela presença do AgHBs por mais de seis meses (figura 5), detectada por meio de testes laboratoriais ou TR. O anti-HBc total, isoladamente, indica contato prévio com o vírus. Por isso, o resultado reagente desse marcador não pode ser interpretado sem a realização de outros marcadores diretos da presença do vírus. Além disso, a janela imunológica para os anticorpos contra o core viral é de aproximadamente 45 dias, posterior ao aparecimento do AgHBs (MINISTÉRIO DA SAÚDE DO BRASIL, 2018)

Figura 5- Curso dos marcadores sorológicos da infecção crônica da Hepatite B



Fonte: adaptado de MTHV, 2018.

Além dos testes sorológicos o ministério da saúde emprega como teste confirmatório os testes moleculares. A carga viral é determinada utilizando-se técnicas de PCR em tempo real, que se mostra mais sensível e confiável. A quantificação da carga viral é um componente crucial na avaliação de pacientes com infecção crônica por HBV e na avaliação da eficácia do tratamento antiviral (LOPES; SCHINONI, 2011)

A metodologia empregada atualmente para a purificação do DNA viral é a separação por micropartículas magnéticas. A separação magnética é uma tecnologia emergente que utiliza magnetismo para a separação eficiente de partículas químicas ou biológicas. A aplicação dessa técnica nas biociências foi restrita até a década de 1970. A ideia de usar técnicas de separação magnética para purificar compostos biológicos (ácidos nucleicos, proteínas, células, organelas entre outros) levou um interesse crescente na última década (BERENSMEIER, 2006).

O termo “magnético” significa que o suporte obtém um momento magnético quando colocado em um campo magnético (Figura 6). A separação magnética de ácidos nucleicos tem várias vantagens, podem ser isolados diretamente de matérias de amostras brutas como sangue, tecidos meios de cultivo, água entre outros (BERENSMEIER, 2006)

Esta é uma maneira rápida, simples e eficiente de separar as partículas após a etapa de ligação ou eluição do núcleo. Também é possível isolar componentes do lisado celular, que inibem por exemplo a DNA polimerase de uma reação de PCR como polissacarídeos ou compostos fenólicos (BERENSMEIER, 2006).

Figura 6 - Procedimento esquemático para purificação de ácidos nucleicos pela tecnologia de esferas magnéticas.



Fonte: adaptado BIOPOLYMER - TECHNOLOGY AG, ALEMANHA.

A carga viral é realizada a partir do soro de pacientes portadores de hepatite crônica por HBV, para avaliação da eficácia do tratamento antiviral (LOPES; SCHINONI, 2011). A quantificação de HBV-DNA é realizada a cada seis meses no portador inativo e a cada 12 meses conforme diagnóstico e tratamento instituído. O ácido nucleico viral pode ser detectado por meio de ensaios de PCR em tempo real, que possuem limite de detecção médio de 10UI/mL de plasma ou soro (MINISTÉRIO DA SAÚDE DO BRASIL, 2018)

Por ser uma técnica de elevada sensibilidade e acurácia, a PCR em tempo real tem sido uma ferramenta aplicada em diversas áreas biomédicas, destacando-se na pesquisa básica e no diagnóstico laboratorial (RAMÍREZ et al., 2015)

Atualmente, os testes descritos para quantificação do vírus da Hepatite B utilizam amostras de soro ou plasma do paciente (BRASIL, 2018). No entanto, a presença do vírus em outros compartimentos biológicos pode ser importante no contexto de reativação da infecção por funcionarem como reservatório para o vírus. (ARIEDE et al., 2015) realizou uma avaliação comparativa da estabilidade do RNA do HCV no plasma e em plaquetas isoladas, e demonstrou que o RNA do HCV nas plaquetas, embora em menor concentração do que no plasma, é mais

preservado da degradação ao longo do tempo, sugerindo que o vírus pode persistir mais tempo no corpo quando associado a plaquetas.

Em outro estudo com o vírus C (PADOVANI et al., 2013) demonstrou que em 100% de plaquetas testadas, o RNA do HCV foi detectado após incubação com o soro contendo o vírus HCV, sugerindo que a interação vírus com a plaqueta não requer o megacariócito como etapa inicial no processo.

Pouco se sabe sobre o carregamento/internalização do vírus da hepatite B em plaquetas, no entanto estudos recentes demonstraram a presença do HBV em outros compartimentos biológicos. (LEMOINNE et al., 2014) demonstrou que vesículas extracelulares (VEs), incluindo microvesículas ou exossomos, servem como veículos para comunicação intercelular e transferência de material genético.

(SUKRITI et al., 2019) destacou a detecção de DNA de HBV nas vesículas extracelulares, enquanto no plasma da mesma amostra a detecção não era possível. Isso indica que as vesículas hepáticas de pacientes portadores do HBV podem atuar como reservatório para o vírus e potencialmente infectar outros hepatócitos, sugerindo que o HBV associado a vesículas seja uma forma alternativa para a infecção e transmissão do HBV aos hepatócitos primários.

A pesquisa pela presença do vírus em outros compartimentos se faz necessária em busca de detectar as possíveis vias de reativação do vírus, como descrito acima muitos vírus já foram descritos utilizando a plaqueta como um reservatório biológico.

As plaquetas são fragmento citoplasmático anucleados presentes no sangue que são produzidas a partir de megacariócitos na medula óssea. Do total das plaquetas presentes no organismo humano, 70% estão presentes na circulação e 30% estão presentes no baço. Elas permanecem na circulação em média de dez dias até serem retiradas por células endoteliais. Têm como função a formação do agregado plaquetário. A adesão plaquetária a parede do vaso danificado é a primeira etapa da hemostasia que envolve a participação das plaquetas. Quando a integridade do sistema vascular é rompida, elas interagem com os componentes da matriz extracelular expostos na parede do vaso sanguíneo, aderindo à parede formando uma espécie de tampão evitando o extravasamento de sangue (CASTRO et al., 2006)

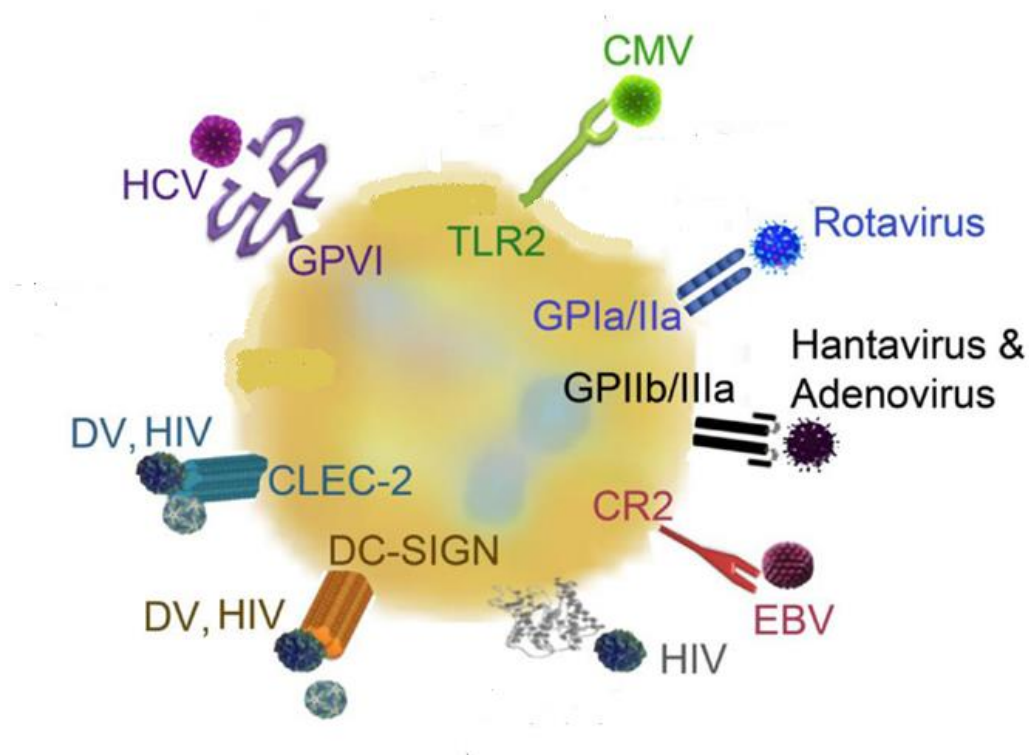
As infecções virais geralmente coincidem com a ativação plaquetária. As respostas inflamatórias do hospedeiro resultam na liberação de mediadores ativadores de plaquetas e em um ambiente pró-

oxidativo e pró-coagulante, que favorece a ativação plaquetária. Contudo, os vírus também podem interagir diretamente com plaquetas e megacariócitos e modular sua função. Além disso, as plaquetas podem ser ativadas por complexos virais antígeno-anticorpo e em resposta a alguns vírus (ASSINGER, 2014)

No entanto, a ativação plaquetária induzida por vírus não apenas modula a contagem de plaquetas, mas também molda as respostas imunes. Foi relatado que as plaquetas contribuem direta ou indiretamente para a persistência do vírus (ASSINGER, 2014). As plaquetas também expressam receptores de superfície, como lectinas, integrinas e receptores toll-like (TLR), permitindo que eles interajam diretamente com vários patógenos.

Alguns vírus que apresentam DNA como seu material genético já foram descritos interagindo com plaqueta como o Citomegalovírus(CMV), Epstein Barr (EBV), Adenovírus, Hantavírus além de vírus de RNA, como o vírus da hepatite C (HCV), vírus da Dengue(DV) e vírus da imunodeficiência humana(HIV) (Figura 7) ((ASSINGER, 2014)

Figura 7 - Representação da interação de vírus com os receptores expressos na superfície da plaqueta.



Similar aos estudos que demonstraram a interação de vírus com plaqueta, a hipótese deste trabalho é que o HBV também interaja com plaquetas dos pacientes, de modo que amostra com plasma rico em plaquetas apresente uma carga viral maior quando comparado com amostra pobre em plaquetas. Se tal hipótese se confirma, os exames atuais por RT-qPCR podem estar subestimados, visto que rotineiramente é utilizado plasma pobre em plaqueta para determinar a carga viral de amostras de pacientes HBV positivos. Além disso, o exame NAT (Teste de Ácido Nucleico por RT-qPCR para HIV, HCV e HBV) utiliza amostra de plasma pobre em plaquetas, e se o vírus apresentar afinidade a plaquetas, uma triagem com plasma rico poderia tomar a técnica de detecção por RT-qPCR mais sensível. Isso impactaria no ciclo de doação de sangue para obtenção de concentrados plaquetário e outros hemocomponentes, inclusive melhoraria a performance dos exames de carga viral para HBV.

3-Objetivo

Avaliar a carga viral do vírus da Hepatite B no plasma pobre em plaquetas comparativamente a carga viral no plasma rico em plaquetas, em amostras excedentes de portadores do vírus atendidos pelo Laboratório de Biologia Molecular do Hemocentro de Botucatu, ponto executor da Rede Nacional de Laboratórios para quantificação do DNA do Vírus da Hepatite B.

4-Material e métodos

Os experimentos desenvolvidos no presente trabalho foram realizados em duas etapas:

Etapa 1: Padronização e Validação dos procedimentos de separação do plasma e obtenção dos plasmas rico e pobre em plaquetas. Para esta etapa foram incluídas 12 amostras de doadores de sangue voluntários do Hemocentro de Botucatu do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu. Todos os voluntários foram triados na rotina laboratorial do hemocentro e considerados aptos à doação.

Etapa 2: Comparação da carga viral do HBV no plasma rico em plaquetas e no plasma pobre em plaquetas. Para esta etapa foram incluídas 20 amostras de plasma excedente de pacientes que foram atendidos pelo Laboratório de Biologia Molecular no Hemocentro de Botucatu, para realizar quantificação do DNA do vírus da hepatite B. Nesta etapa foram incluídas amostras de indivíduos maiores de 18 anos. Foram excluídas amostras de gestantes, pacientes que apresentaram qualquer coinfeção viral ou bacteriana e, outras patologias hepáticas. Estes dados foram obtidos a partir dos prontuários médicos dos pacientes incluídos no estudo.

O presente trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de Botucatu (Número do parecer: 2763468).

Etapa 1: Padronização e Validação dos procedimentos de separação do plasma e obtenção dos plasmas rico (PRP) e pobre (PPP) em plaquetas

As amostras de sangue foram coletadas em tubo do tipo *Vacutainer®* (Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA) contendo 1,5 mg/mL de anticoagulante ácido etilenodiaminotetracético (EDTA). Para separação do plasma foram testados três protocolos de separação:

(a) centrifugação do sangue total à 1356 x g por 10 minutos, padrão utilizado pela rotina para quantificação do DNA do HBV no Laboratório de Biologia Molecular do Hemocentro de Botucatu;

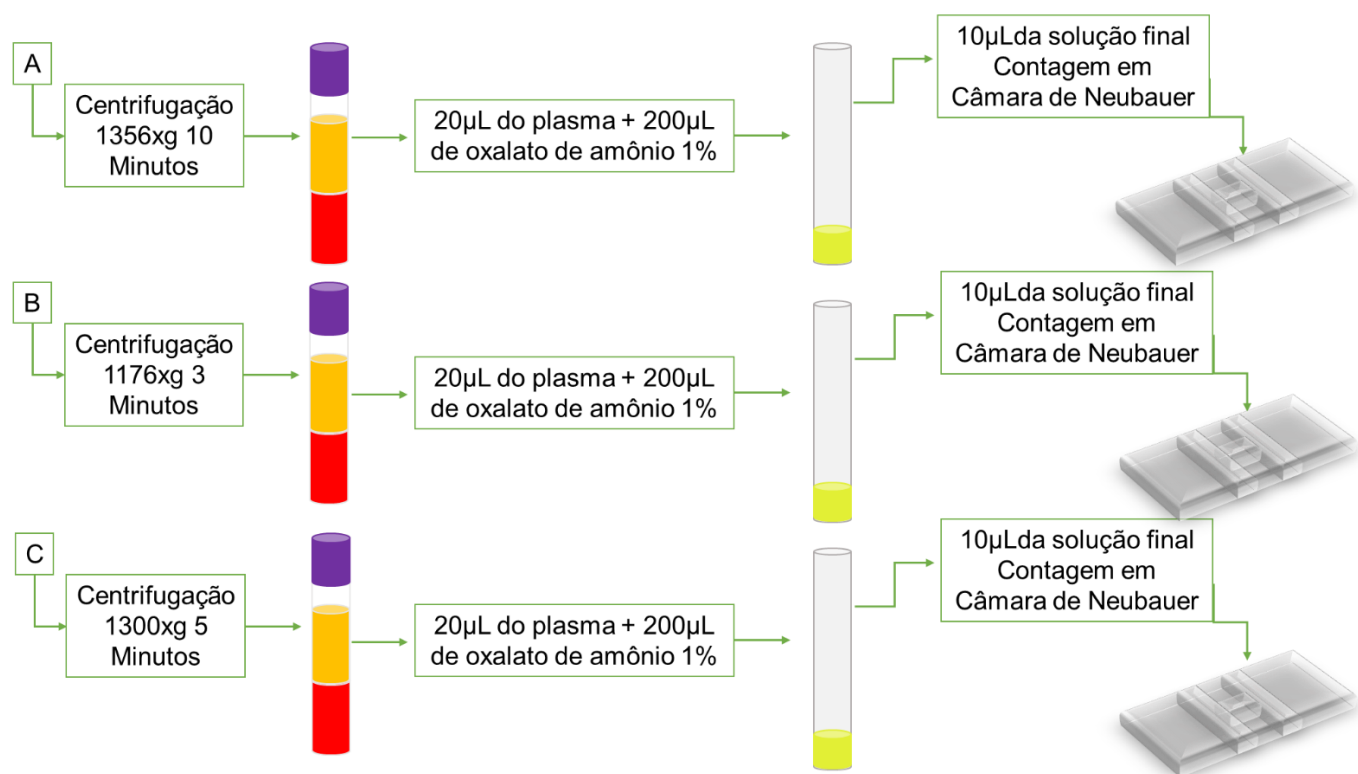
(b) centrifugação do sangue total à 1176 x g por 3 minutos, protocolo descrito para obtenção de plaquetas por Padovani e colaboradores (2010);

(c) centrifugação do sangue total à 1300 x g por 5 minutos, utilizada por nosso grupo de

pesquisa para obtenção de plaquetas.

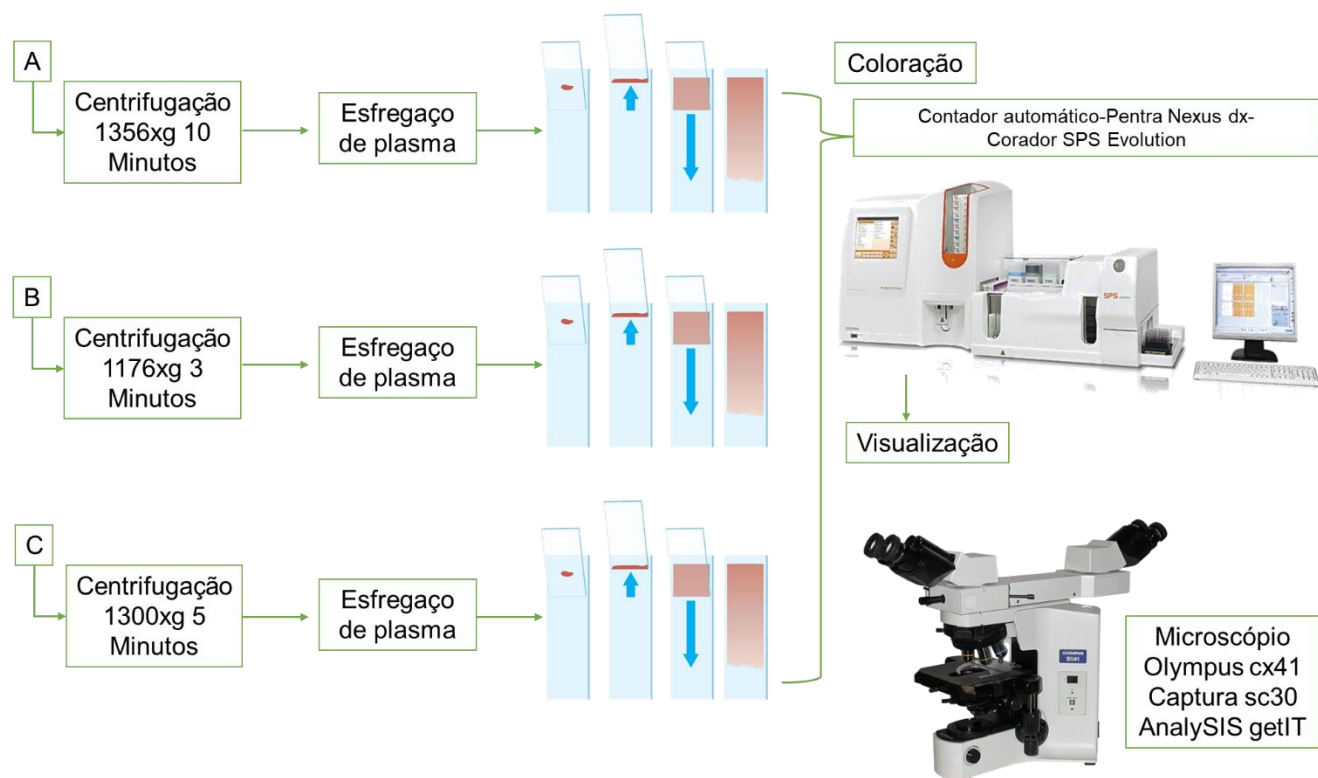
O plasma obtido depois de cada centrifugação foi utilizado para contagem de plaquetas a fim de avaliar a concentração dessas após os procedimentos de centrifugação. Para determinar a concentração de plaquetas no plasma, foi utilizado o protocolo adaptado do Laboratório de Análises Clínicas Veterinárias (LCVET) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul por meio de contagem em Câmara de Neubauer. Este protocolo geralmente é utilizado para sangue total, mas nesse trabalho foi adaptado para amostras de plasma, conforme segue: em um tubo de ensaio foi adicionado 200 μ L da solução diluente (oxalato de amônio 1%) e 20 μ L de amostra de plasma. Em seguida, a amostra foi homogeneizada por inversão, 10 μ L da solução final foi adicionada na Câmara de Neubauer e incubada em câmara úmida por 20 minutos. A contagem das plaquetas foi realizada em microscópio óptico (400X), contando os cinco quadrantes centrais.

Figura 8 – Representação esquemática da padronização e validação dos procedimentos de separação do plasma e obtenção dos plasmas rico (PRP) e pobre (PPP) em plaquetas



Como avaliação suplementar, esfregaço de plasma foram corados pelo Corador SPS Evolution para observação quando a presença de plaquetas e integridade das mesmas.

Figura 9 – Representação esquemática do esfregaço de plasma da padronização e validação dos procedimentos de separação do plasma e obtenção dos plasmas rico (PRP) e pobre (PPP) em plaquetas.

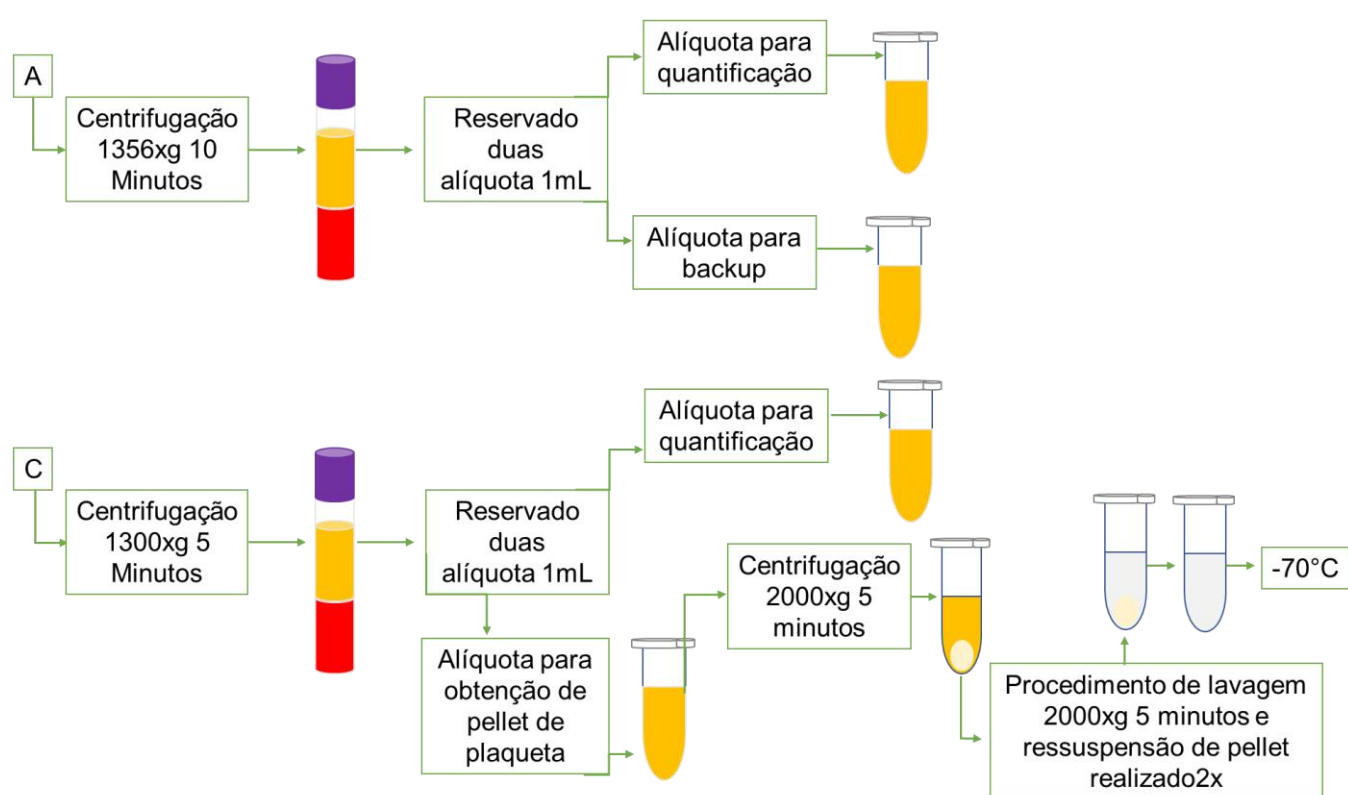


A quantificação das plaquetas foi decisiva para determinar as melhores condições de centrifugação para obtenção de plasmas rico em plaquetas (PRP) e pobre em plaquetas (PPP).

Após determinada as melhores condições de centrifugação, cada amostra foi dividida em dois tubos que foram submetidos a duas centrifugações distintas, condição de centrifugação A e C (vide Resultados e Discussão). Para a centrifugação de 1356xg por 10 minutos (A) foram reservadas duas alíquotas de 1mL cada, uma utilizada para quantificação do DNA do HBV imediatamente e, a outra armazenada como *backup*. Para a centrifugação de 1300xg por 5 minutos (C) também foram reservadas duas alíquotas de 1mL cada, sendo que uma dessas alíquota foi armazenada à -70°C para quantificação posterior e a outra submetida a nova centrifugação de 2000 x g por 5 minutos para

obtenção do *pellet* de plaquetas: o sobrenadante foi descartado e no mesmo tubo foi adicionado 1 mL de tampão de lavagem contendo *Phosphate Buffered Saline* (PBS) com Ácido Etilodiamino tetraacético (EDTA), e o *pellet* foi então ressuspensionado e submetido a nova centrifugação de 2000 x g por 5 minutos. Esse processo foi repetido por mais uma vez, ao fim da última lavagem o *pellet* foi ressuspensionado em 1 mL de tampão de lavagem contendo PBS com EDTA e armazenado à -70°C para posterior quantificação.

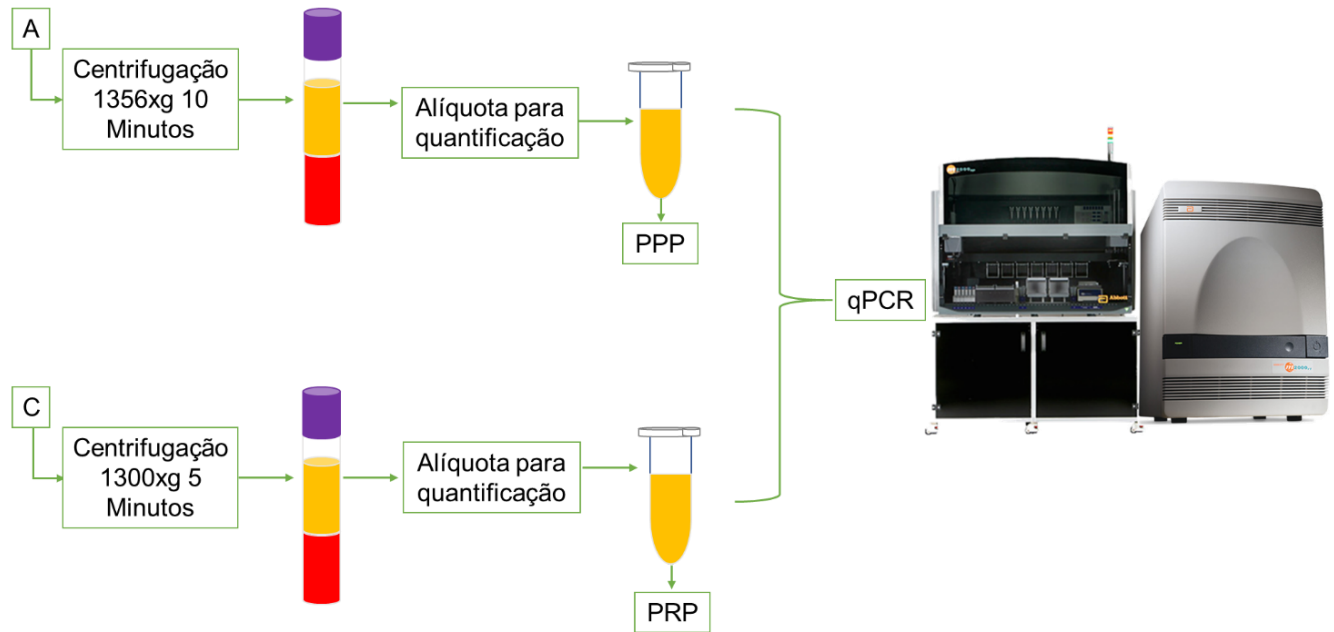
Figura 10 – Representação esquemática da obtenção dos plasmas pobre (PPP) e rico (PRP) em plaquetas.



Etapa 2: Comparação da carga viral do HBV no plasma rico em plaquetas e no plasma pobre em plaquetas

Depois de obtidos os plasmas ricos e pobres em plaquetas, os mesmos foram submetidos a quantificação do DNA do HBV utilizando a metodologia *Abbott RealTime HBV assay* (Abbot Molecular, Des Moines, USA), Segundo as especificações do fabricante.

Figura 11 - Representação esquemática da quantificação dos plasmas pobre (PPP) e rico (PRP) em plaquetas.



5 - Análise estatística

Os testes estatísticos foram aplicados utilizando o software GraphPad Prism 6 (Graphpad.Prism.v6.01.teste). Os dados foram submetidos aos testes de distribuição normal: D'Agostino & Pearson omnibus; Shapiro Wilk e Kolmogorov Smirnov. Foi aplicado o teste de Wilcoxon para os dados de carga viral do “plasma pobre em plaquetas” e “plasma rico em plaquetas” e o Teste T para os dados de logaritmo do “plasma pobre em plaquetas” e logaritmo do “plasma rico em plaquetas”. Em todas as análises estatísticas foi considerado nível de significância de 0,05.

6 - Resultados e discussões

Etapa 1: Padronização e validação dos procedimentos de separação do plasma e obtenção dos plasmas rico (PRP) e pobre (PPP) em plaquetas

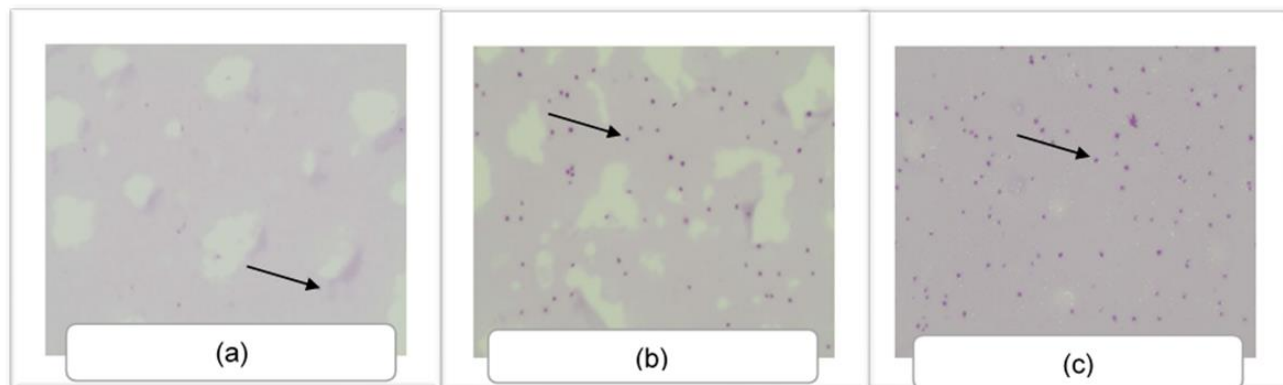
Os resultados da concentração de plaquetas no plasma obtidas depois de cada centrifugação (velocidade e tempo) testadas neste estudo estão na tabela 1.

Tabela 1: Concentração de plaquetas a partir da obtenção do plasma separado por: (a) centrifugação do sangue total à 1356xg por 10 minutos; (b) centrifugação do sangue total à 1176xg por 3 minutos; (c) centrifugação do sangue total à 1300xg por 5 minutos

	A	B	C
HOMEM	92.000/mm ³	290.000/mm ³	394.000/mm ³
	84.000/mm ³	274.000/mm ³	300.000/mm ³
MULHER	114.000/mm ³	416.000/mm ³	462.000/mm ³
	108.000/mm ³	336.000/mm ³	368.000/mm ³

Considerando que os valores de referência para plaquetas oscilam entre 150.000 a 440.000/mm³, para este estudo foi considerada a centrifugação do sangue total à 1356xg por 10 minutos para obtenção de plasma pobre em plaquetas (PPP) e o plasma rico em plaquetas (PRP) a centrifugação do sangue total à 1300xg por 5 minutos, visto que nessa última condição observou-se o maior número de plaquetas em relação à primeira. As melhores condições de centrifugação foram confirmadas pela análise de esfregaço de plasma coradas pelo Corador SPS Evolution (Figura 12), em (a) menor número de plaquetas e em (b) e (c) maior quantidade de plaquetas.

Figura 12 - Resultados obtidos do esfregaço de plasma coradas com o SPS Evolution nos diferentes protocolos de rotação: (a) 1356xg por 10 minutos, (b) 1176xg por 3 minutos e (c) 1300xg por 5 minutos. As setas pretas indicam plaqueta observada em cada campo.



Fonte: Imagens obtidas pelo autor.

A obtenção de plaquetas está diretamente ligada a velocidade e ao tempo de centrifugação, fatores como anticoagulante, sistema de coleta e quantidade de sangue podem direcionar durante a escolha do melhor método de obtenção de plaquetas (EFEUGLU; 2004). Embora alguns estudos demonstrem que protocolos de obtenção de PRP utilizando apenas uma centrifugação resulta em plasma com baixa concentração de plaquetas (MACEDO, 2004) a padronização realizada por este estudo demonstrou uma concentração de plaquetas dentro dos valores de referências esperados.

Etapa 2: Comparação da carga viral do HBV no plasma rico e pobre em plaquetas

Os resultados da quantificação do DNA do HBV em plasma rico e pobre em plaquetas obtidos estão representados na tabela 2. Foi realizado teste de normalidade dos dados para escolha do teste estatístico a ser utilizado. Quando se considerou o valor da carga viral em UI/mL notou-se que a distribuição dos dados não apresentava distribuição normal, sendo assim, foi utilizado o teste de *Wilcoxon* para amostras pareadas para comparar a carga viral do plasma pobre (PPP) e plasma rico em plaquetas (PRP). A carga viral do plasma pobre em plaquetas foi significativamente superior quando comparada à carga viral do plasma rico em plaquetas, $p=0.0004$ (Gráfico 1).

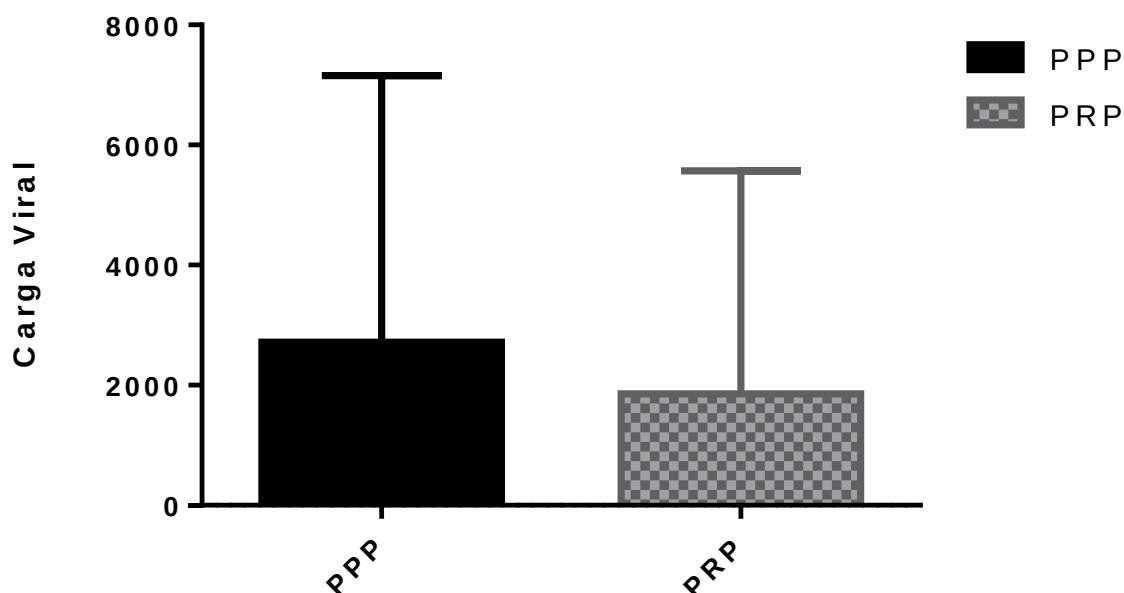
Tabela 2 - Resultados para a quantificação do DNA do HBV (carga viral) no plasma pobre em plaquetas (PPP) e no plasma rico em plaquetas (PRP)

ID	CV_PPP	LOG_PPP	CV_PRP	LOG_PRP
561/18	2.861 UI/mL	3,46	204 UI/mL	2,31
572/18	12 UI/mL	1,07	26 UI/mL	1,42
586/18	14.099UI/mL	4,15	10.190 UI/mL	4,01
612/18	5.007 UI/mL	3,7	1.366 UI/mL	3,14
613/18	326 UI/mL	2,51	258 UI/mL	2,41
616/18	318 UI/mL	2,5	371 UI/mL	2,57
620/18	330 UI/mL	2,52	203 UI/mL	2,31
621/18	41UI/mL	1,61	41 UI/mL	1,62
622/18	2.028 UI/mL	3,31	1.147 UI/mL	3,06
705/18	1.968 UI/mL	3,29	565 UI/mL	2,75
711/18	139 UI/mL	2,14	110 UI/mL	2,04
022/19	1.105 UI/mL	3,04	435 UI/mL	2,64
024/19	865 UI/mL	2,94	359 UI/mL	2,56
071/19	557 UI/mL	2,75	321 UI/mL	2,51
77/19	10 UI/mL	1	13 UI/mL	1,11
82/19	6.166 UI/mL	3,79	4.905 UI/mL	3,69
125/19	485 UI/mL	2,69	469 UI/mL	2,67
146/19	2.630 UI/mL	3,42	2.119 UI/mL	3,33
257/19	15.308UI/mL	4,18	13.916 UI/mL	4,14
337/19	117 UI/mL	2,07	170 UI/mL	2,23

CV: Carga Viral, LOG: logaritmo decimal da carga viral, PPP: Plasma Pobre em Plaquetas, PRP: Plasma Rico em Plaquetas

Segundo especificações do fabricante (Abbott RealTime HBV®) variações nos resultados de carga viral da mesma amostra não devem ser significativos e, o método utilizado é validado para utilização em plasma ou soro. No entanto os resultados obtidos mostraram uma diferença significativa e, uma das hipóteses é que, variações encontradas entre amostras do mesmo indivíduo, sugerem que a metodologia utilizada não é eficaz para esse tipo de amostra.

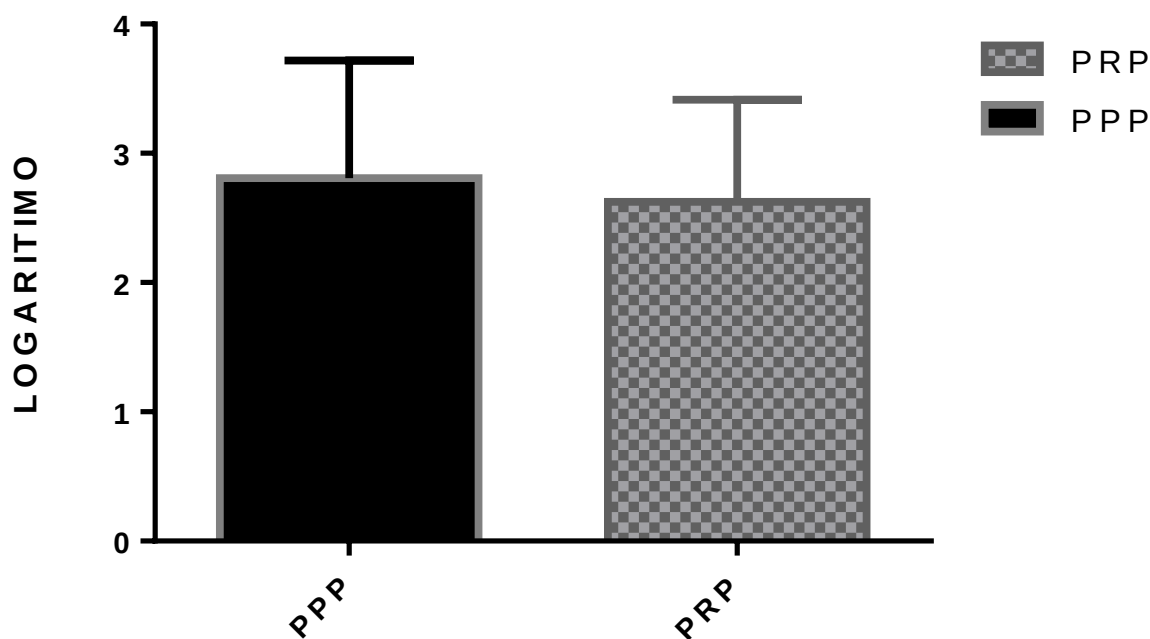
Gráfico 1: Carga viral do plasma pobre em plaquetas (PPP) e plasma rico em plaquetas (PRP), $p=0,0004$ (Teste de Wilcoxon)



As mesmas avaliações foram realizadas para o logaritmo da carga viral no plasma pobre em plaquetas e plasma rico em plaquetas e, neste caso houve distribuição normal dos dados, utilizando-se o teste *T de Student* para amostras pareadas. Os resultados mostraram que o resultado anterior reproduziu-se na avaliação do logaritmo decimal da carga viral sendo que o plasma pobre em plaquetas apresentou log da carga viral superior quando comparado ao plasma rico em plaquetas, $p=0,0210$ (Gráfico 2). A hipótese inicial desse estudo não foi comprovada diante dos resultados obtidos.

Como já é bem documentado que vírus apresentam interação com a plaqueta, podendo ou não ser internalizado por elas, o que poderia explicar a persistência do vírus modulando uma resposta imunológica favorável à sobrevivência do vírus (ASSINGER, 2014). Com base no estudo realizado por (SANADA et al., 2017), que sugere uma via alternativa para infecção por HBV por meio de vesículas extracelulares e também por outros estudos que mostraram que o HBV pode interagir com outros compartimentos biológicos, formulou-se a hipótese deste estudo de que o PRP apresentaria maior carga viral do que o PPP, visto que haveria adição do DNA viral presente nas plaquetas ao DNA total extraído das partículas virais do plasma.

Gráfico 2: Logaritmo decimal da carga viral no plasma pobre em plaquetas (PPP) e no plasma rico em plaquetas (PRP), $p=0,0210$, teste *T de Student*.



Os resultados obtidos neste estudo corroboram com o estudo de (BATTISTAM, 2019) no qual a carga viral do Vírus da Hepatite C (HCV) em plasma rico e pobre em plaquetas apresentaram diferença significativa. Embora os dois vírus sejam distintos, a metodologia utilizada para quantificação viral apresenta o mesmo princípio.

A metodologia de extração de DNA utilizada neste estudo, por *beads* magnéticas carregadas positivamente, é considerada uma extração mais restrita para determinado grupo amostral, as esferas magnéticas são capazes de reter ácido nucleico após uma precipitação com sal e etanol, porém não são específicas para ácidos nucleicos, ou seja, as esferas magnéticas podem reter em sua superfície outras biomoléculas, caracterizando uma limitação da técnica para sua utilização (BERENSMEIER, 2006)

A extração por *beads* magnéticas carregada positivamente permite a ligação do DNA que possui carga negativa, porém outros componentes presentes na amostra que possuam carga negativa podem se ligar as *beads*, gerando uma competição entre esses compostos e o DNA viral. Sendo

assim, a eficiência do método dependerá da concentração destes interferentes e, da capacidade de saturação das *beads*.

Uma possível explicação para os resultados obtidos se relaciona ao princípio do método de extração utilizada, gerando competição de biomoléculas no momento de ligação do DNA do HBV com as *beads*, uma vez que a partícula revestida de cloridrato de guanidina, agente caotrópico destinado a desnaturar proteínas em baixas concentrações, e íons Gdn^+ e Cl^- que podem neutralizar as cargas de cadeias laterais de aminoácidos carregadas positiva e negativamente, reduzindo ou eliminando interações eletrostáticas que possam estabilizar proteínas. Em altas concentrações, o cloridrato de guanidina se torna um agente desnaturante independentemente do tipo de interação eletrostática presente na proteína (ANDREA, 2012)

Segundo (ANDREA, 2012) as concentrações 0,2; 0,4 e 0,6 molar foram utilizadas para causar desestabilização da proteína. Estima-se que a concentração de cloridrato de guanidina presente nas *beads* utilizadas pode não ter sido suficiente para realizar a desnaturação completa dos interferentes presentes nas amostras.

A literatura demonstra que os métodos de extração de DNA variam quanto ao princípio de isolar e purificar o DNA dos demais componentes celulares da amostra. Quanto maior a pureza, integridade e quantidade, melhor será o desempenho de um teste molecular facilitando o diagnóstico (DHALIWAL, 2013). Um método de extração eficiente que nos fornece DNA livre de inibidores, íntegro e em quantidade suficiente para garantir a sensibilidade das técnicas moleculares (SANTOS et al, 2009).

Assim, se levanta à hipótese de que no processo da extração de DNA do HBV pode estar existindo interferentes, os quais podem estar dificultando a obtenção do DNA viral.

Para comprovar a hipótese que justifica os resultados aqui observados, novos experimentos foram realizados.

Considerando que o interferente se constitua a metodologia de extração novas amostras com carga viral conhecidas foram utilizadas e selecionadas para avaliação, para constituição de um *pool* com carga viral determinada previamente. Esse *pool* foi realizado para definir qual protocolo de extração demonstraria melhor desempenho perante os grupos amostrais estudados.

Em seguida o *pool* foi dividido e processado em duplicata para os seguintes grupos (a) Grupo 1: extração de DNA foi realizada utilizando o Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega

Cooperation, Madison, WI, USA), segundo as especificações do fabricante com acréscimo do controle interno da qPCR da metodologia *Abbott RealTime HBV assay* (Abbot Molecular, Des Moines, USA); (b) Grupo 2: a etapa de lise foi realizada com o Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega Cooperation, Madison, WI, USA) com adição do controle interno e, seguiu-se as etapas de lavagens e eluição de DNA com o uso do QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN Inc, Valencia, CA, USA); (c) Grupo 3: extração de DNA foi realizada utilizando o QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN Inc, Valencia, CA, USA), sem adição do controle interno e; (d) Grupo 4: extração de DNA foi realizada utilizando o Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega Cooperation, Madison, WI, USA), sem adição do controle interno.

A qPCR foi realizada utilizando os reagentes do *Abbott RealTime HBV assay* (Abbot Molecular, Des Moines, USA) e a corrida realizada no equipamento *Applied Biosystems 7500 Real Time PCR System* (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA).

Os resultados da qPCR para o HBV obtidos a partir dos quatro grupos avaliados estão na tabela 3. Os grupos 2 e 4 foram os que tiveram melhor desempenho e reprodutibilidade. Assim, optou-se por utilizar o protocolo da extração de DNA do grupo 4 para os próximos experimentos. Procedimento do grupo 4 é baseado na extração por colunas de sílica e os reagentes apresentam propriedades necessárias para executar com excelência uma purificação por coluna sendo que a presença do isotiocianato de guanidina no tampão de lise e no tampão de lavagem são suficientes para a extração do DNA total da amostra (com ou sem plaquetas).

O isotiocianato de guanidina quebra as ligações de hidrogênio, interações de Van der Waals e hidrofóbicas, criando condições para a ligação dos ácidos nucleicos com a membrana de sílica (HIMEDIA, 2020). A utilização do álcool na etapa da lise e na purificação confere ao DNA alto grau de pureza, resultando na precipitação do ácido nucleico (REGITANO, 2008).

Tabela 3: Resultados para a quantificação do DNA do HBV (carga viral) nos quatro grupos avaliados

	C.V_P1	LOG_P1	C.V_P2	LOG_P2
GRUPO 1	2.560.353UI/mL	6,4083	5.319.490UI/mL	6,72587
GRUPO 2	4.077.462UI/MI	6,61039	4.187.337UI/mL	6,621938
GRUPO 3	8.249.203UI/mL	6,916412	1.358.116UI/mL	7,132937
GRUPO 4	7.874.137UI/mL	6,896203	7.174.390UI/mL	6,855785

CV: Carga Viral, LOG: logaritmo decimal da carga viral, Grupo 1: extração de DNA foi realizada utilizando o Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega Corporation, Madison, WI, USA), segundo as especificações do fabricante sendo que o controle interno da qPCR da metodologia *Abbott RealTime HBV assay* (Abbot Molecular, Des Moines, USA) foi incorporado no tampão de lise do kit; Grupo 2: a etapa de lise foi realizada com o Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega Corporation, Madison, WI, USA) com adição do controle interno e, seguiu-se as etapas de lavagens e eluição de DNA com o uso do QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN Inc, Valencia, CA, USA); Grupo 3: extração de DNA foi realizada utilizando o QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN Inc, Valencia, CA, USA), sem adição do controle interno e; Grupo 4: extração de DNA foi realizada utilizando o Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega Corporation, Madison, WI, USA), sem adição do controle interno.

Em resumo, o uso das colunas de sílica elevou o rendimento da extração e, um tempo mais curto de isolamento de DNA quando comparado a outras metodologias, resultados concordantes com o estudo de (HIMEDIA, 2020). Muitos estudo comparativos tem destacado a metodologia por colunas de sílica com alto desempenho para se obter concentração e pureza de ácidos nucleicos (CARDOZO et al., 2009)

Com base nestes resultados novas amostras foram selecionadas das quais foram obtidas plasma pobre em plaquetas e plasma rico em plaquetas conforme protocolo utilizado neste estudo. DNA foi extraído dos plasmas utilizando a metodologia do Grupo 4 validada por este estudo e a qPCR realizada.

Novos testes com kit de extração por coluna estão representados na tabela 4. Foi avaliado se os dados obtidos tinham distribuição normal utilizando três testes: D'Agostino & Pearson omnibus; *Shapiro Wilk*; Kolmogorov Smirnov e, nenhum dos grupos apresentou distribuição normal.

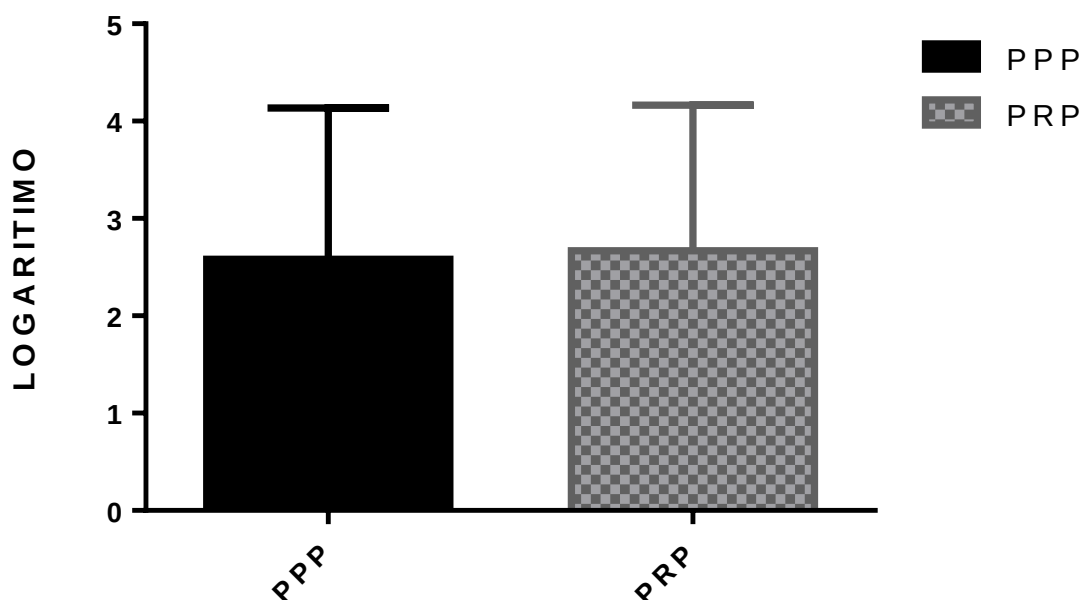
Tabela 4: Resultados para a quantificação do DNA do HBV (carga viral) no plasma pobre em plaquetas (PPP) e no plasma rico em plaquetas (PRP)

ID	C.V. PRP	LOG PRP	C.V. PPP	LOG PPP
567/19	5.150 UI/mL	3,71	6.674 UI/mL	3,82
569/19	7 UI/mL	0,82	5 UI/mL	0,74
628/19	395 UI/MI	2,60	64 UI/mL	1,81
630/19	1.663 UI/mL	3,22	710 UI/mL	2,85
634/19	102 UI/mL	2,01	193 UI/mL	2,29
635/19	3.388 UI/mL	3,53	715 UI/mL	2,85
659/19	77 UI/mL	1,89	45 UI/mL	1,66
665/19	811 UI/mL661	2,91	643 UI/mL	2,81
695/19	14.625 UI/mL	4,17	44.090 UI/mL	4,64
696/19	142 UI/mL	2,15	122 UI/mL	2,09
723/19	101.113.932UI/mL	8,00	121.799.919UI/mL	8,09
745/19	263 UI/mL	2,42	183 UI/mL	2,26
746/19	2.528 UI/mL	3,40	2.512 UI/mL	3,40
747/19	83 UI/mL	1,92	135 UI/mL	2,13
748/19	452 UI/mL	2,66	537 UI/mL	2,73

CV: Carga Viral, LOG: logaritmo decimal da carga viral, PPP: Plasma Pobre em Plaquetas, PRP: Plasma Rico em Plaquetas

A carga viral do plasma pobre em plaquetas e a carga viral do plasma rico em plaquetas não mostrou diferença significativa (Teste de Wilcoxon, $p=0,7841$), o mesmo resultado foi observado quando se comparou o logaritmo decimal da carga viral do HBV no PPP e no PRP (Gráfico 3, Teste T de *Student* não paramétrico, $p=0,2108$).

Gráfico 3: Logaritmo decimal da carga viral do plasma pobre em plaquetas (PPP) e do plasma rico em plaquetas (PRP), $p=0,2108$ (Teste de T de *Student*)



Os resultados obtidos sugerem que as diferenças de carga viral no PPP e no PRP são dependentes da metodologia utilizada. Um grupo de pacientes representativo de todo o Brasil deve ser avaliado nos moldes deste estudo para avaliar qual seria o impacto da utilização de PPP ou soro na quantificação do DNA do HBV.

O presente estudo demonstrou que a extração por coluna de sílica indica minimizar as diferenças encontradas entre os diferentes tipos de amostras avaliadas neste estudo. A metodologia de extração de DNA por coluna de sílica mostra melhor eficiência quando comparada com a metodologia por *beads*. A utilização da sílica e reagentes combinados muito provavelmente minimiza a competição com outros compostos, permitindo que o DNA se ligue a sílica em uma concentração otimizada reduzindo a interferência de outras moléculas pela ação combinada dos agentes caotrópicos, álcool e digestão enzimática.

Essa metodologia em especial tem demonstrado ser a melhor indicação quando se trata de pureza e integridade do DNA. O bom desempenho de técnicas de isolamento de ácidos nucleicos, em quantidade, pureza e integridade adequadas é uma fase essencial na prática da biologia molecular diagnóstica (SIMONATO et al., 2007).

7 – Conclusões

- ✓ A hipótese deste estudo de existir maior carga viral do HBV no plasma rico em plaquetas quando comparada à carga viral do plasma pobre em plaquetas foi refutada. Sugerindo que as diferenças de carga viral no PPP e no PRP são dependentes da metodologia utilizada.
- ✓ A metodologia por *beads* para extração do DNA pode sofrer interferentes de outras moléculas biológicas presentes na amostra e, assim impactar no resultado da carga viral do HBV
- ✓ A metodologia por colunas de sílica para extração do DNA minimiza a variabilidade molecular das amostras utilizadas na determinação da carga viral do HBV

8 - Referências Bibliográficas

ANDREA, M. G. D. Caracterização Físico-química da Asparaginase de *Escherichia coli*. p. 177, 2012.

ARIEDE, J. R. et al. Platelets can be a biological compartment for the Hepatitis C Virus. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 46, n. 2, p. 627–629, jun. 2015.

ASSINGER, A. Platelets and Infection “ An Emerging Role of Platelets in Viral Infection. **Frontiers in Immunology**, v. 5, 18 dez. 2014.

BARROS JÚNIOR, G. M. et al. Hepatite crônica B oculta: prevalência e aspectos clínicos em população de elevada endemicidade de infecção pelo vírus da hepatite B na Amazônia Ocidental Brasileira. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 41, n. 6, p. 596–601, dez. 2008.

BATTISTAM, D. C. **Avaliação da Carga Viral do Vírus da Hepatite C (VHC) no Plasma Pobre em Plaquetas**. [s.l.] Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de Botucatu, 2019.

BERENSMEIER, S. Magnetic particles for the separation and purification of nucleic acids. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 73, n. 3, p. 495–504, 25 dez. 2006.

BLOCK, T. M.; RAWAT, S.; BROSGART, C. L. Chronic hepatitis B: A wave of new therapies on the horizon. **Antiviral Research**, v. 121, p. 69–81, set. 2015.

BRASIL, M. DA S. S. DE V. EM S. D. DE V. E. Hepatites virais Hepatites virais Hepatites virais. v. 49, p. 1–6, 2018.

CARDOZO, D. M. et al. Extração de DNA a partir de sangue humano coagulado para aplicação nas técnicas de genotipagem de antígenos leucocitários humanos e de receptores semelhantes à imunoglobulina. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 42, n. 6, p. 651–656, dez. 2009.

CASTRO, H. C. et al. Plaquetas: ainda um alvo terapêutico. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 42, n. 5, p. 321–332, out. 2006.

DATTA, S. et al. Molecular Biology of the Hepatitis B Virus for Clinicians. **Journal of Clinical and Experimental Hepatology**, v. 2, n. 4, p. 353–365, dez. 2012.

DE MELLO, F. M. M. A. et al. Hepatitis b virus genotypes and mutations in the basal core promoter and pre-core/core in chronically infected patients in southern brazil: A cross-sectional study of hbv genotypes and mutations in chronic carriers. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 47, n. 6, p. 701–708, 2014.

EFEUGLU, C.; AKÇAY, Y. D.; ERTÜRK, S. A modified method for preparing platelet-rich plasma: An experimental study. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 62, n. 11, p. 1403–1407, nov. 2004.

FONSECA, J. C. F. DA. História natural da hepatite crônica B. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 40, n. 6, p. 672–677, 2007.

HIMEDIA. Biologia molecular kits de Extração/Purificação de DNA e RNA. p. 23, 2020.

KANN, M. Intracellular transport of hepatitis B virus. **World Journal of Gastroenterology**, v. 13, n. 1, p. 39, 2007.

LAMONTAGNE, R. J.; BAGGA, S.; BOUCHARD, M. J. Hepatitis B virus molecular biology and pathogenesis. **Hepatoma Research**, v. 2, n. 7, p. 163, 1 jul. 2016.

LEMOINNE, S. et al. The emerging roles of microvesicles in liver diseases. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, v. 11, n. 6, p. 350–361, 4 jun. 2014.

LOPES, T. G. S. L.; SCHINONI, M. I. Aspectos gerais da hepatite B. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, v. 10, n. 3, p. 337, 1 jan. 2011.

MACEDO, A. P. Plasma Rico Em Plaquetas : Uma Análise Quantitativa E Plasma Rico Em Plaquetas : Uma Análise Quantitativa E. **Repositorio.Ufsc.Brrepositorio.Ufsc.Br**, 2004.

MINISTÉRIO DA SAÚDE DO BRASIL. Diagnóstico das hepatites virais. **Ministério da Saúde**, v. 2, 2018.

NI, Y. et al. Hepatitis B and D Viruses Exploit Sodium Taurocholate Co-transporting Polypeptide for Species-Specific Entry into Hepatocytes. **Gastroenterology**, v. 146, n. 4, p. 1070- 1083.e6, abr. 2014.

OLIVEIRA, C. M. C. Análise Molecular E Implicações Biológicas Do Vírus Da Hepatite B, Em Pacientes Naturais Do Estado Do Amazonas. **Universidade Federal Do Amazonas Programa Multi-Institucional De Pós-Graduação Em Biotecnologia** 2007.

PADOVANI, J. L. et al. In vitro detection of hepatitis C virus in platelets from uninfected individuals exposed to the virus. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 46, n. 2, p. 154–155, abr. 2013.

RAMÍREZ, J. C. et al. Analytical Validation of Quantitative Real-Time PCR

Methods for Quantification of Trypanosoma cruzi DNA in Blood Samples from Chagas Disease Patients. **The Journal of Molecular Diagnostics**, v. 17, n. 5, p. 605–615, set. 2015.

REGITANO, L. Extração de DNA para Aplicação em Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 53, n. 9, p. 287, 2008.

RODRIGO, P.; FIS, A. Equipe Corpo Editorial Conselho Consultivo. p. 1–176, 2018.

SAEED, U.; WAHEED, Y.; ASHRAF, M. Hepatitis B and hepatitis C viruses: a review of viral genomes, viral induced host immune responses, genotypic distributions and worldwide epidemiology. **Asian Pacific Journal of Tropical Disease**, v. 4, n. 2, p. 88–96, abr. 2014.

SANADA, T. et al. Transmission of HBV DNA Mediated by Ceramide-Triggered Extracellular Vesicles. **Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology**, v. 3, n. 2, p. 272–283, mar. 2017.

SANTOS, N. A. Caracterização Molecular Do Vírus Da Hepatite B Em Pacientes Cronicamente Infectados Em Um Centro De Referência Em Goiânia-Go. [s.l.] **Universidade Federal de Goiás**, 2019.

SAÚDE, MI. DA. Coleção Institucional do Ministério da Saúde. v. 15, n. Hepatite C, p. 408, 2007.

SEEGER, C.; MASON, W. S. Molecular biology of hepatitis B virus infection. **Virology**, v. 479–480, p. 672–686, maio 2015.

SIMONATO, L. E. et al. Avaliação de dois métodos de extração de DNA de material parafinado para amplificação em PCR. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 43, n. 2, p. 121–127, abr. 2007.

SUKRITI, S. et al. Extracellular vesicles from hepatitis B patients serve as reservoir of hepatitis B virus DNA. **Journal of Viral Hepatitis**, v. 26, n. 1, p. 211–214, jan. 2019.