

Universidade Estadual Paulista - UNESP

Faculdade de Medicina de Botucatu

Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia em Clínica Médica

Natália Picelli

**Coinfecção pelos Vírus da Hepatite C (VHC) e
Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV):
Polimorfismo dos Sistemas HPA -1, -3 e -5**

Botucatu

2013

Natália Picelli

**Coinfecção pelos Vírus da Hepatite C (VHC) e
Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV):
Polimorfismo dos Sistemas HPA -1, -3 e -5**

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós- Graduação em
Fisiopatologia em Clínica Médica da
Faculdade de Medicina de Botucatu-
UNESP, para obtenção do título de
mestre em Fisiopatologia em Clínica
Médica.

Orientadora: Dra. Maria Inês de Moura Campos Pardini

Coorientadora: Dra. Rejane Maria Tommasini Grotto

Botucatu

2013

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

Picelli, Natália.

Coinfecção pelos vírus da hepatite C (VHC) e vírus da imunodeficiência humana (HIV) : polimorfismo dos sistemas HPA -1, -3, -5 / Natália Picelli. - Botucatu: [s.n.], 2013

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

Orientador: Maria Inês de Moura Campos Pardini

Coorientador: Rejane Maria Tommasini Grotto

Capes: 20804008

1. Hepatite C – Tratamento. 2. AIDS (Doença). 3. HIV (Vírus) – Tratamento. 4. Polimorfismo (Genética). 5. Fígado – Doenças – Infecção. 6. Hepatite por vírus. 7. Coinfecção.

Palavras-chave: Coinfecção; HIV; HPA; VHC.

**Este Trabalho foi realizado no Laboratório de Biologia
Molecular do Hemocentro de Botucatu – Faculdade de
Medicina - UNESP**

Dedicatória

Dedicatória

Dedico esse trabalho...

Aos meus amados pais Eliani e Sergio e ao meu irmão Lucas por me apoiar e estarem ao meu lado nessa longa jornada...

Ao meu filho Gabriel pela paciência e entendimento dessa fase da minha vida...



Agradecimentos

Agradecimentos

Durante esses anos, tive a oportunidade de conhecer e conviver com vários tipos de pessoas. Pessoas que trabalham em diferentes áreas, em diferentes setores e lugares. Pessoas simpáticas, antipáticas, bem humoradas, mal humoradas, pessoas prontas para ajudar, pessoas nem sempre prontas para ajudar, pessoas de bem com a vida e pessoas de mal com a vida. De cada pessoa, eu soube extrair o que ela tinha de melhor, e acrescentar à minha essência. Conheci também pessoas que me mostraram que os conceitos que formamos, sem as conhecer, são conceitos completamente errados. Aprendi que cada pessoa é de um jeito, e cabe a nós aprendermos a conviver em harmonia.

Entretanto não poderia deixar de fazer agradecimentos especiais a algumas pessoas.

- A Deus que traçou e guiou meu caminho até aqui. Obrigada por estar sempre comigo me dando força e fé para seguir sempre em frente.
- Ao meu filho que é a luz que ilumina todos os meus dias, o ar que eu respiro. Obrigada por esse amor incondicional, e pelos momentos de carinho.
- Aos meus pais Sergio e Eliani por sempre me apoiarem, seja qual for o caminho que eu decida seguir, por serem meu porto seguro, por me amarem e me compreenderem, sem vocês tudo seria mais difícil.
- Ao meu namorado Junior, por me apoiar, pelas palavras de carinho e pela paciência nessa etapa tão delicada.
- A minha orientadora Dr^a Maria Inês de Moura Campos Pardini, que confiou em mim como profissional, que disse as palavras certas nos momentos certos, obrigada pela dedicação e confiança.

- A minha coorientadora Dr^a Rejane Maria Tommasini Grotto, por acreditar mais uma vez em mim, pelas horas dedicadas a minha dissertação e por estar ao meu lado quando precisei. Obrigada pelo carinho.
- A Dr^a Adriana Camargo Ferrasi pelas conversas, conselhos e palavras amigas.
- A equipe do Laboratório de rotina Diagnósticas do Hemocentro, Regina, Maércio, Rosângela, Sarita, as aprimorandas, Bianka e Francine, obrigada por me acompanharem nessa etapa da minha vida pela ajuda profissional, pelos ensinamentos e momentos de descontração.
- A todos os funcionários do Hemocentro, em especial a Mariana e Adaise, obrigada pela companhia, risadas e palavras amigas.
- As minhas queridas amigas e companheira, Fernanda Nalli, Carla e Thaís pela amizade, risadas, conversas e muito companheirismo.
- As minhas companheiras de todo dia do laboratório de Biologia Molecular, pesquisa, obrigada pela ajuda nessa fase final de meu mestrado.
- Ao Dr. Alexandre Naime Barbosa, pela ajuda com os pacientes e prontuários, pela amizade, pelas divertidas conversas e conselhos. Com certeza te levarei por toda a minha carreira como um exemplo de profissional, meus eternos agradecimentos.
- Ao Dr. Giovanni Faria Silva, pela colaboração neste trabalho, sempre pronto para tirar dúvidas e nos ajudar. Obrigada pela ajuda e experiência nas biópsias e com pacientes que levo pra toda vida.

- Aos “meus” queridos pacientes que doaram amostras para que esse trabalho fosse desenvolvido. Que Deus ilumine o caminho de vocês e que eu possa ser uma das peças desse imenso quebra-cabeças que é a cura.
- A Capes, pelo auxílio financeiro ao longo desses anos.
- A secretária do programa de pós-graduação em Fisiopatologia em Clínica Médica, Ana, e a secretária do programa de pós-graduação em Biotecnologia Médica, Janice, pela ajuda e apoio nessa etapa final.
- Aos funcionários da Pós Graduação pelos serviços prestados e pela clareza das explicações em nossas dúvidas, e prontidão em ajudar.
- A todos que compõem a equipe de pesquisa do laboratório de Biologia Molecular, meu obrigada pela ajuda e companhia.
- Aos membros da minha banca de qualificação e defesa, por disponibilizarem um pouco do seu tempo para compor a banca e dar conselhos para a melhoria deste trabalho, meu muito obrigada.
- E por último, e nada menos importante as minhas queridas amigas, sim eu posso chamá-las de amigas, Tainara, Aline Aki, Aline Galvani, Natália Cantão, Sarita e Jovita. Muito obrigada por estarem sempre ao meu lado, nos momentos bons e ruins, por me motivarem, por ouvirem minhas reclamações e minhas conquistas. Obrigada pelas nossas jantãs, baladas, finais de semana, conversas, risadas, reuniões, inimigos secretos, viagens para congressos, telefonemas, em fim obrigada por tudo, sem vocês aqui tudo seria mais difícil com certeza.

A todos que contribuíram de alguma forma na realização desse trabalho meus sinceros agradecimentos.

Επίγραφε

Epigrafe

*"A vida é como andar de bicicleta. Para ter
equilíbrio é preciso manter-se em movimento"*

(Albert Einstein)

Prefácio

Prefácio

O volume aqui apresentado intitulado **Coinfecção pelos Vírus da Hepatite C (VHC) e Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV): Progressão da fibrose e Polimorfismo dos Sistemas HPA -1, -3 e -5**, constitui mais um estudo, de caráter inédito, na linha de pesquisa Associação de Polimorfismos dos Antígenos Plaquetários Humanos (HPA) em infecções virais iniciada no Laboratório de Biologia Molecular, do Hemocentro de Botucatu, Faculdade de Medicina, Unesp, com a publicação, em 2009, do primeiro artigo do grupo intitulado "*Allelic Frequencies of HPA-1 to -5 Human Platelet Antigens in Patients Infected With Hepatitis C Virus*", inédito na literatura científica mundial.

Biomédica de formação, minha vida acadêmica foi iniciada com a Iniciação Científica, ainda na graduação, ocasião em que tive a oportunidade de trabalhar com a investigação dos polimorfismos HPA em pacientes coinfectados com os vírus VHC/HIV. Seguindo a mesma linha de pesquisa, com pacientes coinfectados VHC/HIV e Antígenos Plaquetários Humanos (HPA) ingressei no Mestrado e, os capítulos apresentados aqui constituem o produto destes anos de trabalho.

Capítulo I: Constitui uma introdução com subsídios necessários ao entendimento dos temas abordados nos artigos científicos que se seguem.

Capítulo II: "*Human Platelet Polymorphism can be a genetic marker associated with HIV/HCV coinfection.*", **artigo submetido** ao periódico "*Journal of Medical Virology*"

Capítulo III: "Avaliação do polimorfismo HPA dos sistemas HPA-1, -3 E -5, na progressão da fibrose em pacientes coinfectados VHC/HIV."

Natália Picelli

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CRFs: Formas Recombinantes Circulatórias

DNA: Acido desoxirribonucléico

E1: Glicoproteínas do envelope 1

E2: Glicoproteínas do envelope 2

env: Gene do envelope do HIV

gp120: Glicoproteína 120 do envelope Viral do HIV

gp41: Glicoproteína 41 do envelope Viral do HIV

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

IFN- α : Interferon α

IL- 10: Interleucina 10

IL-28: Interleucina 28

gag: Gene *gag* do vírus do HIV

GPs: Glicoproteínas

HLA: Antígeno Leucocitário Humano (*Human Leukocyte Antigen*)

HPA: Antígenos Plaquetários Humanos (*Human Platelet Antigens*)

Kb: kilobases

Kda: Kilodaltons

LTR: *Long terminal repeat*

nef: Gene *nef* do genoma do HIV

nm: Nanômetros

NS2: Proteína não estrutural 2 do genoma do VHC

NS3: Proteína não estrutural 3 do genoma do VHC

NS4A: Proteína não estrutural 4A do genoma do VHC

NS4B: Proteína não estrutural 4B do genoma do VHC

NS5A: Proteína não estrutural 5A do genoma do VHC

NS5B: Proteína não estrutural 5B do genoma do VHC

OMS: Organização Mundial da Saúde

ORF: *Open Reading Frame*

PDGF: Fator de crescimento derivado de plaquetas (*Platelet-Derived Growth Factor*)

pol: Gene da polimerase do vírus do HIV

RBV: Ribavirina

RNA: Ácido Ribonucléico

RVS: Resposta Viroológica Sustentada

CD: *Cluster differentiation*

TGF- β 1: Fator de Crescimento Transformante β 1 (*Transforming Growth Factor β 1*)

TNF α : Fator de necrose tumoral (*Tumor Necrosis Factor*)

UTR: Região não traduzida (*Untranslate region*)

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

***vif*:** Gene *vif* do genoma do HIV

***rev*:** Gene *rev* do genoma do HIV

***vpr*:** Gene *vpr* do genoma do HIV

***vpu*:** Gene *vpu* do genoma do HIV

***tat*:** Gene *tat* do genoma do HIV

α 2: Alfa 2

β 3: Beta 3

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1: Esquema representativo da estrutura do Vírus da Hepatite C, evidenciando RNA viral, capsídeo e envelope.

FIGURA 2: Esquema representativo do genoma do VHC, evidenciando os genes codificadores das proteínas estruturais e não estruturais e, seus produtos protéicos com suas respectivas funções.

FIGURA 3: Árvore Filogenética representando a distribuição dos sete genótipos e vários subtipos do VHC.

FIGURA 4: Representação esquemática das glicoproteínas da membrana plaquetária, evidenciando os principais Antígenos Plaquetários Humanos (HPA). Sistemas HPA -1, -3, -4 e -5 residem em glicoproteínas da família das integrinas.

FIGURA 5: Figura 5: Esquema representativo da estrutura do Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV), evidenciando RNA viral, capsídeo, envelope, glicoproteínas de membrana e a enzima transcriptase reversa.

Sumário

Sumário

Capítulo I	20
Introdução.....	22
Capítulo II	53
Artigo: Human Platelet Polymorphism can be a genetic marker associated with HIV/HCV coinfection.	55
Capítulo III.....	69
Artigo: Avaliação do polimorfismo HPA dos sistemas HPA-1, -3 E -5, na progressão da fibrose em pacientes coinfectados VHC/HIV	71
Documentos Anexos	83
Anexo 1: Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa	84
Anexo 2: Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa	85

Capítulo I

**Coinfecção pelos Vírus da Imunodeficiência
Humana e Vírus da Hepatite C, Progressão da
Fibrose hepática, Resposta Antiviral e
Polimorfismos dos Antígenos Plaquetários
Humanos**

Introdução

A hepatite C crônica constitui um grave problema de saúde pública devido ao seu grande potencial de evolução para cirrose e hepatocarcinoma (STRAUSS, 2001). A doença é resultante da infecção por um vírus do gênero *Hepacivirus* e da família *Flaviviridae*, denominado vírus da hepatite C (VHC) ou, do inglês, *Hepatitis C Virus* (HCV) (SIMMONDS et al., 2005). Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) há cerca de 180 milhões de pessoas infectadas no mundo (WHO, 2008), constituindo a causa mais comum de doença hepática crônica assim como a mais freqüente indicação para transplante hepático (COELHO, 2001). No Brasil, segundo o Ministério da Saúde, do total de casos de hepatite C registrados entre 1999 e 2011, 55.222 foram na região Sudeste e 18.307, na Sul. Juntas, a região Sul e Sudeste representam 90% dos casos confirmados de Hepatite C nesse período no país (BRASIL, 2012).

O VHC é um vírus de RNA de aproximadamente 50nm de diâmetro, com genoma em fita simples de 9,7 kb, flanqueado por duas regiões não traduzidas (3' e 5' – *untranslated region* UTR). Com uma única região aberta de leitura (ORF), o RNA viral codifica uma poliproteína precursora de 3.000 aminoácidos, a qual é clivada por proteases celulares e virais, originando várias proteínas estruturais e não-estruturais. As proteínas estruturais são representadas pela proteína C (proteína do core) e glicoproteínas do envelope, denominadas E1 e E2/NS1. As proteínas não-estruturais são classificadas como: NS2, NS3, NS4a, NS4b, NS5a e NS5b (SIMMONDS et al., 2005).

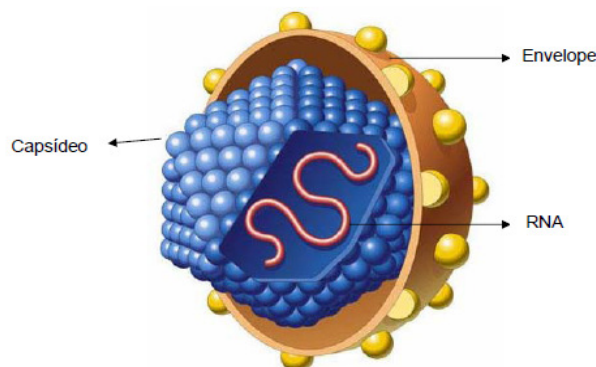


Figura 1: Esquema representativo da estrutura do Vírus da Hepatite C, evidenciando RNA viral, capsídeo e envelope. (Adaptado de CARNEIRO, 2005).

Das regiões genômicas virais, a 5'UTR e 3'UTR apresentam menor diversidade entre os diferentes isolados virais por serem essenciais no processo de síntese da poliproteína e na replicação viral (LINDERBACH; RICE, 2001). Esta região apresenta mais de 90% de similaridade entre as diferentes sequências (BUKH et al., 1992).

A região 5' UTR é constituída de, aproximadamente, 341 nucleotídeos, possuindo uma estrutura secundária complexa com configuração em alças (*stem – loops*), a qual constitui importante sítio de entrada ribossomal durante a síntese protéica (CLARKE, 1997; MAJOR; FEINSTONE, 1997; PURCELL, 1997; FLINT; MCKEATING, 2000; ROINGEARD et al., 2004).

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

As proteínas estruturais, proteína C (core), E1 e E2 (envelope) e possivelmente a proteína p7 são resultantes da clivagem na região amino-terminal da poliproteína, por ação de uma protease celular (FLINT; MCKEATING, 2000; LANDFORD; BIGGER, 2002).

A proteína C é a segunda região mais conservada do genoma viral e constitui o nucleocapsídeo do vírus (SIMMONDS et al., 1993; ZEIN, 2000) sendo codificada pelo gene *core*. É imunogênica e regula a apoptose das células infectadas, além disso, pode interferir no metabolismo de lipídeos e na supressão da resposta imunológica do hospedeiro (LAI; WARE, 2000; MCLAUCHLAN, 2000).

Diferente da proteína C, as glicoproteínas do envelope E1 e E2 são glicosiladas e possuem regiões extremamente variáveis (SIMMONDS et al., 1993; ZEIN, 2000), formando um complexo não covalente responsável pela formação do envelope (DUBUISSON et al., 2002). São importantes no processo de ligação ao receptor celular e da fusão do envelope viral com a membrana da célula do hospedeiro (BARTOSH; DUBUISSON; COSSET, 2003).

O peptídeo p7, é uma proteína hidrofóbica pequena composta por 63 aminoácidos, provavelmente envolvida na replicação do VHC. Embora sua função, ainda, não esteja totalmente esclarecida (LINDENBACH; RICE, 2005), pode funcionar como um canal iônico na membrana celular (PAVILOVIC et al., 2003) e, estudos mostram que a p7 pode ter um importante papel na maturação e liberação do vírus (GRIFFIN et al., 2003).

A porção carboxi-terminal da poliproteína codifica as proteínas não-estruturais NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A, NS5B, as quais estão envolvidas basicamente na replicação viral (GERMER; ZEIN, 2001), exercendo funções enzimáticas essenciais nesse processo (SUZUKI et al., 1999).

A proteína NS2 é uma proteinase zinco dependente e tem como única função conhecida a participação na clivagem proteolítica na junção NS2/NS3 (YAMAGA; OU, 2002).

A NS3 é uma proteína multifuncional, com função serina protease, responsável, principalmente, pelos eventos de clivagem que ocorrem na porção não estrutural da proteína precursora (ROINGEARD et al., 2004).

A NS4A é um co-fator essencial da proteína NS3, formando o complexo NS3/NS4A, necessário para o processamento da poliproteína (CLARKE, 1997; OKAMOTO, 1997). A região NS3/NS4A vem sendo considerada um alvo para a

terapia antiviral, uma vez que sua inibição poderia estar relacionada com o bloqueio da replicação do VHC (FRANCO; CLOTET; MARTINEZ, 2008).

A NS4B organiza o denominado complexo de replicação que promove estabilidade das proteínas do vírus e do RNA durante a replicação (EINAV, 2004).

A proteína NS5A é uma fosfoproteína, que apresenta uma forma basal de 56kDa e, uma hiperfosforilada de 58kDa (REED; GORBALENYA; RICE, 1998).

A proteína NS5B é uma RNA polimerase RNA dependente, e é indispensável para a replicação do VHC (BEHRENS; TOMEI; FRANCESDO, 1996). Esta enzima não apresenta atividade de reparo e, o que se relaciona com a diversidade genética do VHC (SIMMONDS et al., 1993). A figura 2 mostra a organização genômica e, as proteínas resultantes da expressão gênica do VHC.

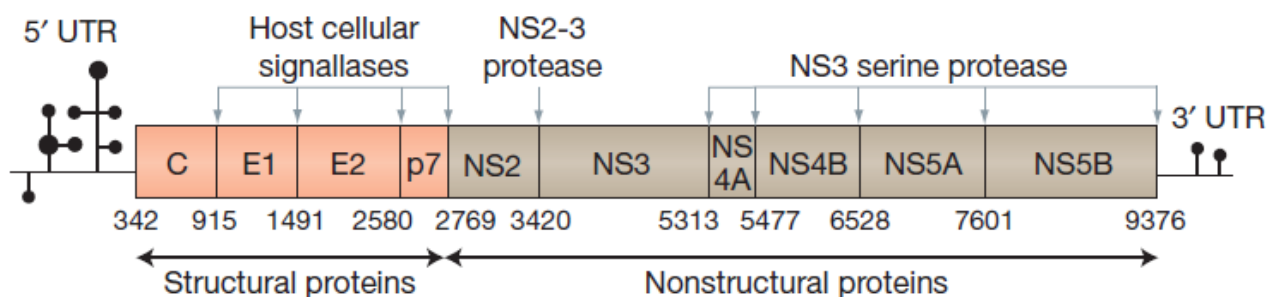


Figura 2: Esquema representativo do genoma do VHC, evidenciando os genes codificadores das proteínas estruturais e não estruturais e, seus produtos protéicos com suas respectivas funções. (ROE AND RALL, 2008)

A variabilidade genética do genoma viral distingue vários genótipos e subtipos. A classificação utilizada, até então, é a de seis genótipos (1 a 6) os quais divergem em aproximadamente 25 a 35% nas sequências de nucleotídeos, vários subtipos (SIMMONDS et al., 2004), divergindo entre si de 15 a 20% na sequência de nucleotídeos sendo que essa diferença varia de acordo com a região do genoma (PAWLOTSKY, 2004). Recentemente um novo genótipo foi descrito sendo

designado genótipo 7a (MURPHY et al., 2007), embora ainda existam poucos relatos de sua ocorrência (GOTTWEIN et al., 2009; KUIKEN; SIMMONDS, 2009). No Brasil, os genótipos 1, 2 e 3 são os mais frequentes, com predominância do genótipo 1 na maioria dos estados (BRASIL, 2005).

A ausência de atividade de reparo das enzimas virais conduz a uma alta taxa de mutações, responsável pela elevada variabilidade genética e, sob pressão do sistema imunológico do hospedeiro, populações heterogêneas são selecionadas. As populações virais com pequenas diferenças em sua sequência genômica, mas estritamente relacionadas, são designadas *quasispecies* e, podem surgir simultaneamente no mesmo indivíduo (FARCI; PURCELL, 2000; LYRA; FAN; BISCEGLIE, 2004). As *quasispecies* podem estar presentes no início da infecção ou surgir ao longo dela decorrente de mecanismos de adaptação e escape as defesas do organismo (HONDA et al., 1994; NAITO; HAYASHI; KAMADA, 1995).

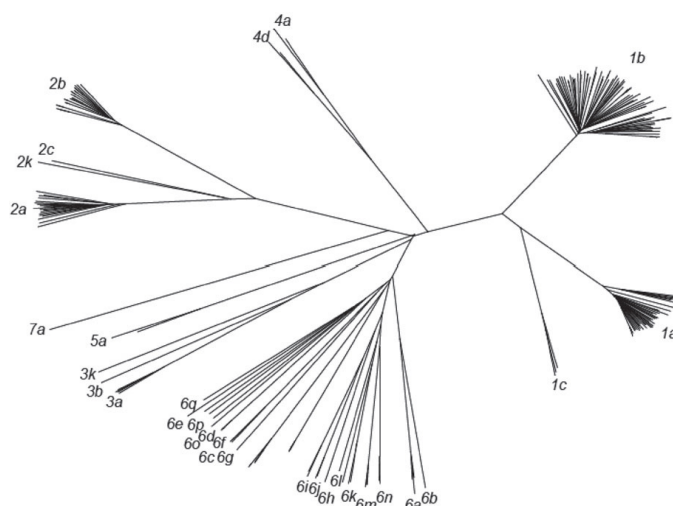


Figura 3: Árvore Filogenética representando a distribuição dos genótipos e subtipos do VHC, incluindo o genótipo 7. (Adaptado de CHAYAMA; HAVES, 2011).

Embora as células alvo do VHC sejam os hepatócitos, estudos mostraram a presença do RNA viral em outros tipos celulares como os linfócitos T e B, (PAVIO;

LAI, 2003), monócitos, macrófagos, (BOOTH; WATERS; THOMAS, 1996; MULLER et al., 1995) e células dendríticas (NAVAS et al., 1998). Além disso, já foi demonstrado que o VHC pode ser transportado na corrente sanguínea de um indivíduo infectado pelas plaquetas (HAMAIA et al., 2001).

As plaquetas humanas, fragmentos citoplasmáticos anucleados presentes na circulação resultantes da fragmentação de megacariócitos na medula óssea (ITALIANO; HARTWING, 2002; RELOU et al., 2003), expressam vários tipos de antígenos em sua superfície, dentre os quais os antígenos plaquetários humanos ou HPA (*Human Platelet Antigens*) (SCHOROEDER; RAYNER, 1993). Existem cinco sistemas de antígenos mais estudados denominados HPA -1, -2, -3, -4 e -5. Estes antígenos são formados por segmentos protéicos polimórficos situados no interior de glicoproteínas 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 (METCALFE et al., 2003; LUCAS; METCALFE, 2000). Há mais de trinta tipos diferentes de glicoproteínas ligadas à membrana plaquetária, porém, aquelas relacionadas aos HPAs são os complexos GPIa-IIa, GPIIb-IIIa e GPIb-IX (SANTOSO, 2000). A figura 2 ilustra algumas glicoproteínas da superfície da membrana plaquetária, nas quais residem os HPA mais estudados.

O complexo GPIa-IIa é uma integrina, constituída pela associação não covalente de uma subunidade $\alpha 2$ e outra $\beta 1$. Existem aproximadamente de 800 – 2.800 cópias desse heterodímero por plaqueta, que também está presente em linfócitos T ativados e outras células (ELENA, 2007).

O GPIIb-IIIa é, também, uma integrina, exerce um papel importante na agregação plaquetária. Com aproximadamente de 50 – 80.000 cópias por plaquetas,

exige Ca^{+} para exercer sua função (CHARO; KIEFFER; PHILLIPS, 1994). A GPIIb (CD41) apresenta uma cadeia extracelular pesada de 116KDa associada covalentemente a uma ponte disulfito e uma cadeia transmembrana de 25KDa. Já a GPIIIa (CD61), é uma proteína glicosilada de 100kDa, que contém três domínios, um grande extracelular com 28 pontes disulfuro, um domínio transmembrana e um segmento citoplasmático no C- terminal (LEFKOVITS; PLOW; TOPOL, 1995; ELENA, 2007)

O complexo glicoprotéico GPIb-IX, está envolvido nas etapas iniciais da agregação plaquetária. Há aproximadamente 25.000 cópias desse complexo por plaqueta (ELENA , 2007).

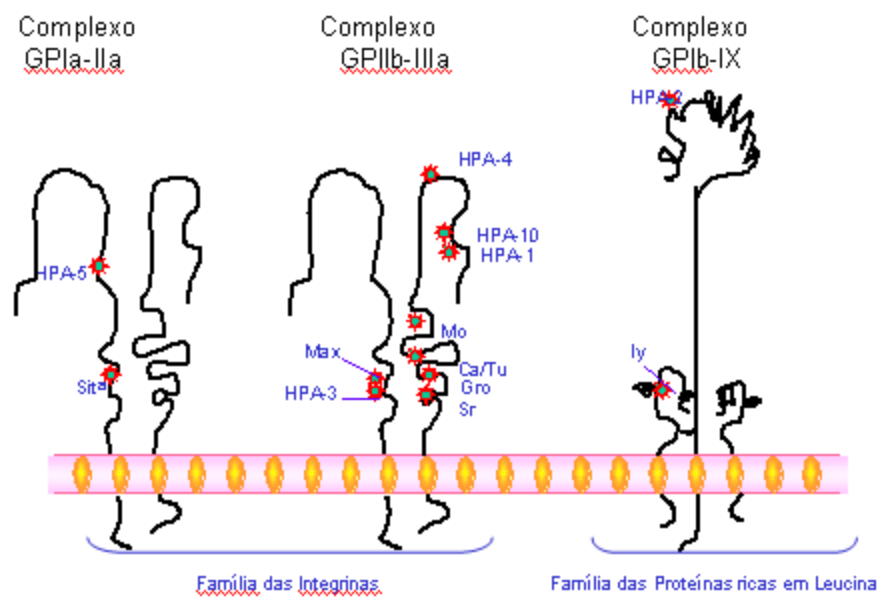


Figura 4: Representação esquemática das glicoproteínas da membrana plaquetária, evidenciando os principais Antígenos Plaquetários Humanos (HPA). Sistemas HPA -1, -3, -4 e -5 residem em glicoproteínas da família das integrinas (Adaptado de TORALLES-PEREIRA, 2001).

Os cinco sistemas HPA de maior relevância clínica, já associados a doenças plaquetárias são HPA -1, -2, -3, -4 e -5, dos quais o -1, -3, -4 e -5 residem nas proteínas GPIa-IIa e GPIIb-IIa, da família das integrinas.

Embora, o RNA do VHC já tenha sido encontrado em plaquetas (HERNANDEZ et al., 1998) e, estas sejam carreadoras do vírus *in vivo* (HAMAIA; LI; ALLAIN, 2001; ALMEIDA et al., 2004), estes fragmentos citoplasmáticos não apresentam o CD81 em sua membrana, principal receptor utilizado pelo vírus para entrada nos hepatócitos (HAMAIA; LI; ALLAIN, 2001). Dessa forma, deve existir outra molécula envolvida na interação do VHC com plaquetas.

Estudos têm sugerido a participação de outras proteínas neste processo, uma das quais a fibronectina, uma proteína de adesão celular (PUGLIESE et al., 2004). No mesmo sentido, outras proteínas de adesão celular já foram associadas à entrada do VHC no hepatócito (AGNELLO et al., 1999; CORMIER et al., 2004; EVANS et al., 2007; LIU et al., 2009;). Desta forma, outras proteínas de adesão celular presentes na membrana plaquetária poderiam estar envolvidas na ligação do VHC com as plaquetas como as proteínas da família das integrinas, nas quais residem alguns HPA (BERGELSON et al. 1992; WICKHAM et al., 1993). Além disso, as integrinas são frequentemente encontradas associadas à tetraspaninas, como o CD81 (BERGELSON et al., 1992; BERDITCHEVSKI, 2001) e, estas proteínas já foram associadas à entrada de alguns echovírus e adenovírus (WICKHAM et al., 1993) a suas células alvo.

Um estudo recente demonstrou uma associação entre o aumento da frequência alélica do HPA-5b em portadores de VHC quando comparados ao grupo controle, sem o vírus, sugerindo uma associação entre a presença deste alelo e o VHC (VERDICHIO-MORAES et al., 2009). Nesta mesma linha, um recente estudo

demonstrou uma associação do HPA -1a/1b com a evolução da fibrose em pacientes mono infectados pelo VHC (SILVA et al., 2012).

A infecção crônica pelo vírus da hepatite C apresenta diferentes evoluções em cada paciente, a cirrose hepática (CH) ocorre em cerca de 20% dos casos, geralmente após 15 a 20 anos de infecção (TONG et al., 1995; SEEFF, 1997; CORROA et al., 1998).

Um longo período de hepatite crônica, com graus variados de fibrose antecede a evolução para a cirrose. A fibrose apresenta uma progressão gradual ao longo do curso da doença evoluindo para o desarranjo arquitetural do fígado caracterizado por acúmulo de matriz extracelular, perda de microvilosidades e alterações na função dos hepatócitos e na microcirculação. (POYNARD et al., 1997). Esse processo é o resultado da cicatrização de repetidas lesões (FRIEDMAN, 2003).

Embora vários elementos celulares sejam capazes de sintetizar e depositar componentes da matriz extracelular (colágeno, elastina, proteoglicanos e proteínas de constituição) como os fibroblastos e hepatócitos, as principais células envolvidas no processo de fibrogênese são as células estreladas do fígado, que são responsáveis pela maior produção dos elementos dessa matriz no fígado lesionado (GABELE et al., 2003; FRIEDMAN, 2003).

No fígado normal essas células encontram-se inativas, e localizadas no espaço de Disse, e é um dos principais locais de armazenamento de vitamina A e de gordura. Após uma lesão crônica essas células sofrem ação de citocinas fibrogênicas como TGF- β , TNF- α , PDGF entre outras e são ativadas, se diferenciando fenotipicamente para miofibroblastos, adquirindo propriedades inflamatórias, de proliferação, motilidade, fibrogênicas e contratilidade, exercendo então seu papel na evolução da fibrose (MILANI et al., 1990; MARRA, 1999;

PINZANI & MARRA, 2001, FRIEDMAN, 2004; PINZANI & ROMBOUTS, 2004; ANDRADE, 2005; TILLAMAN et al., 2005; GUYOT et al., 2006 TSUKADA et al., 2006).

No processo de fibrose hepática todos os componentes da matriz extracelular se encontram em grande concentração no tecido hepático, e essas modificações na matriz auxiliam na evolução do processo fibrótico, (PARISE, 2001) o qual conduz a diversas alterações progressivas que comprometem a atividade hepática com o passar do tempo a medida que a fibrose evolui.

Desta forma, é importante avaliar o estadiamento da fibrose hepática (POYNARD et al., 1997) o que, atualmente é realizado pela biópsia hepática. Esta avaliação hepática considera as alterações clássicas das hepatites crônicas e agregados linfóides proeminentes nos espaços-porta, além da lesão de ductos biliares e esteatose (POYNARD et al., 2000; POYNARD et al. 2003). A biópsia hepática é um procedimento invasivo, que na maior parte das situações é essencial para estadiamento da hepatite crônica e para definição da necessidade de tratamento (SCHUER, 1991). Com base no resultado obtido na biópsia hepática o grau de fibrose pode ser caracterizado e, atualmente, a classificação mais utilizada é o escore do sistema METAVIR, no qual F0 significa ausência de fibrose, F1 fibrose portal sem septos, F2 expansão fibrosa com poucos septos, F3 numerosos septos podendo visualizar esboços de nódulos e F4 cirrose (POYNARD et al., 1997). Em algumas situações a biópsia hepática percutânea é contraindicada. Em caso de pacientes com obesidade mórbida, com possibilidade de lesões hepáticas vasculares, coagulopatias graves, infecções no parênquima hepático e obstrução biliar extrahepática (BRASIL, 2011).

Também não é necessária a realização da biópsia hepática em pacientes portadores de coagulopatias congênitas e em pacientes coinfectados com o vírus HIV a realização da biópsia é facultativa. A biópsia hepática também não é necessária para indicação de tratamento em pacientes com sinais clínicos e evidência ecográficas de cirrose (BRASIL, 2011).

Embora a progressão da fibrose já tenha sido relacionada com sexo, idade à infecção, consumo de álcool, coinfecção com o Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) e/ou Vírus da Hepatite B (POYNARD et al., 2000; FREEMAN et al., 2001; SEEFF et al., 2002) fatores genéticos do hospedeiro vêm sendo relacionados à esta progressão. Estes fatores genéticos podem explicar tantas respostas diferentes relacionadas ao mesmo agente etiológico (AFDHSL E NUNES, 2004). Estes fatores incluem antígeno leucocitário humano (HLA), polimorfismos genéticos no gene da interleucina 10 (IL-10), no fator de necrose tumoral (TNF- α), angiotensinogênio, fator de crescimento transformante β 1 (TGF- β 1) (POWELL et al., 2000), interleucina 28 (IL-28), que foi associada ao clareamento espontâneo do Vírus da Hepatite C independente dos fatores virais (DI JULIO et al, 2011) e recentemente o HPA (SILVA et al., 2012).

A influência deste mesmo fator genético (HPA) também foi recentemente associada a não respondedores em tratamento antiviral independente do esquema terapêutico utilizado (SILVA et al., no prelo). O tratamento visa uma resposta virológica sustentada (RVS) que corresponde à persistência de viremias indetectáveis seis meses após o tratamento (ZEUZEM et al., 2004), o aumento na expectativa de vida e melhora na qualidade de vida e a diminuição da taxa de transmissão da doença. A terapia inicialmente utilizada para hepatite C crônica foi o

Inferferon alfa recombinante (IFN- α) com eficácia limitada (POYNARD et al., 1996; LIN et al, 1995). A associação com a Ribavirina (RBV) elevou o efeito do IFN- α (POYNARD et al., 1998; LAI et al., 1996; MCHUTCHISON et al., 1998), no entanto, formas modificadas de interferon, como o Interferon Peguilado foram desenvolvidas e, elevaram significativamente a porcentagem de RVS (MANNS et al., 2001; FRIED et al., 2002).

Os genótipos estão muito relacionados ao sucesso do tratamento com antivirais. A taxa de RVS nos pacientes infectados com o genótipo 1, principalmente o 1b, é significativamente inferior à que se observa em pacientes infectados com os outros genótipos, principalmente o 2 e o 3 (POYNARD et al., 2000). Desta forma, no Consenso Internacional sobre Hepatite C de 1999 foi estabelecido que a duração do tratamento de infecções por genótipos não-1 do VHC deve ser de seis meses enquanto que para pacientes infectados com o genótipo 1 a duração pode ser prolongada por até 1 ano dependendo da carga viral apresentada antes do tratamento (EASL, 1999).

No Brasil, os esquemas terapêuticos até o ano de 2011 seguiam a Portaria 34/SVS/MS. Segundo esta portaria pacientes com hepatite C crônica virgens de tratamento, portadores do genótipo 1 do VHC deveriam receber a combinação interferon peguilado e ribavirina por até 48 semanas segundo monitoramento da carga viral plasmática por metodologias moleculares quantitativas, enquanto que, aqueles infectados pelos genótipos não-1 do VHC deveriam ser tratados com Interferon convencional associado à Ribavirina por 24 semanas (BRASIL, 2007). Em julho de 2011, uma nova portaria foi aprovada. Nessa portaria foi estabelecido que, pacientes com hepatite C crônica portadores do genótipo 2 e 3 seriam tratados com interferon convencional associado a Ribavirina por 24 semanas. No caso da

existência de fatores preditores de baixa resposta ao tratamento com o interferon convencional como F3, manifestações de cirrose hepática e carga viral superior a 600.000UI/mL, os pacientes seriam tratados com interferon peguilado associado a ribavirina com duração de 24 a 48 semanas. Os pacientes portadores de genótipo 1, seria considerado a duração do tratamento até 72 semanas, aos que apresentarem uma boa adesão com RVS parcial na semana 12 e RNA indetectável na semana 24 (BERG et al., 2006; PEARLMAN et al., 2007; SANCHEZ et al., 2007). Além disso, a nova portaria prevê a introdução dos inibidores de protease, Boceprevir e Telaprevir, em indivíduos que não responderam ao esquema terapêutico convencional, e que obedecerem alguns critérios para o tratamento. (BRASIL, 2012).

No caso de pacientes coinfetados, a portaria 221 do ministério da saúde, indica o uso de PEG-IFN associado a RBV durante 48 a 72 semanas independente do genótipo (diretrizes). Em casos de pacientes assintomáticos que apresentarem a contagem de linfócitos T-CD4+ acima de 500 células/mm³, recomenda priorizar o tratamento para Hepatite C (BRASIL, 2010). Já em pacientes assintomáticos que apresentarem contagem de linfócitos T-CD4+ entre 350 e 500 células/mm³, início do tratamento antirretroviral (TARV) deve ser considerado, lembrando que o início concomitante de ambos os tratamentos pode acarretar acúmulo de toxicidade e comprometimento da adesão (WSC et al., 2009), detalhes que devem ser discutidos com profissionais especializados em coinfeção. Em pacientes que apresentarem contagem de linfócitos T-CD4+ inferior a 350 células/mm³ há indicação de iniciar TARV (KITAHAKA et al., 2009) a introdução do tratamento para hepatite C deve ser individualizada e iniciada após a estabilização clínica e imunológica em pacientes com indicação de tratamento para o VHC.

Embora, a influência dos fatores genéticos do hospedeiro já tenha sido bem documentada na infecção pelo VHC, na evolução da fibrose hepática e, na resposta ao tratamento, a maioria dos estudos apresenta como foco, pacientes monoinfectados pelo VHC. Assim, pouco se conhece sobre a influência destes fatores em indivíduos coinfectados VHC/HIV. Recentemente, um estudo mostrou uma maior frequência do genótipo HPA -1a/1b em coinfectados VHC/HIV (PICELLI et al., no prelo).

A coinfecção VHC/HIV é um evento freqüente atualmente. Na população mundial, cerca de 10 a 30% das pessoas que são infectadas pelo HIV, são coinfectadas pelo VHC, devido ao fato de compartilharem algumas rotas de transmissão. (DIETERICH, 1999). Esta porcentagem pode variar dependendo dos diferentes grupos de risco, sendo elevada entre usuários de drogas injetáveis chegando a 75% (SULKOWSKI, 2008) e hemofílicos (ZYLBERBERG; POL, 1996; DODIG; TAVILL, 2001). No Brasil, a importância epidemiológica da coinfecção VHC/HIV reflete-se na grande porcentagem de indivíduos infectados com variações regionais. Estudos de prevalência realizados apontam índices de 14,3% em Belo Horizonte, MG (CARMO et al., 2002) 17,7% em São Paulo, SP (MENDES-CORREA et al., 2000) e Vitória, ES (MOTTA, 2013), 37,0% em Santos, SP (SEGURADO et al., 2004), 53,8% em Campinas, SP (PAVAN et al., 2003) e 58,3% em Florianópolis, SC (TREITINGER et al., 1999).

A coinfecção com o HIV agrava as manifestações causadas pelo VHC, elevando a velocidade de progressão para cirrose, insuficiência hepática, e Carcinoma Hepatocelular, conduzindo a um pior prognóstico de ambas as doenças em razão do aumento da morbidade e mortalidade (PUOT et al., 2004).

Desde 1980, o ano do início da viremia do HIV no Brasil, foram registrados até o mês de junho de 2011, 608,230 caso de HIV, sendo que a maioria desses casos é do sexo masculino, embora a razão de sexo vem diminuindo ao longo dos anos. (BRASIL, 2004). Em relação às regiões do país, no ano de 2010 a uma taxa de incidência de 14,3/100.000 habitantes na Região Sul, 12,8 no Norte, 9,2 no Sudeste, 7,9 no Centro-Oeste, e 6,9 no Nordeste (BRASIL, 2012).

O HIV é um retrovírus envelopado lipoprotéico, com 10nm de diâmetro, com genoma constituído de duas fitas simples idênticas de RNA, (MORROW; PARK; WAKEFIELD, 1994) de 9,2 kb envoltos por um núcleo protéico (CONNOR; HO, 1992). O genoma viral é constituído por nove genes, sendo três estruturais (*gag*, *env*, *pol*) e seis regulatórios (*vif*, *vpr*, *tat*, *rev*, *vpu*, *nef*) flanqueados por duas seqüências análogas denominadas LTR (*long terminal repeat*) (DEWHURST, 1999).

O gene *gag* codifica uma poliproteína, a qual após clivagem origina as proteínas virais da matriz, do capsídio e do núcleocapsídio viral (CONNOR e HO, 1992).

O gene *pol* codifica uma poliproteína gag-pol de 16KDa que após clivagem proteolítica origina as enzimas virais protease, transcriptase reversa e integrase. A atividade da transcriptase reversa é fundamental ao ciclo replicativo do HIV uma vez que é responsável pela síntese de DNA a partir do RNA viral, sendo uma DNA polimerase RNA-dependente. Do mesmo modo que para o VHC, a ausência de atividade de reparo da transcriptase reversa impede a correção de possíveis erros que possam ocorrer durante a síntese de DNA, o que conseqüentemente leva a uma elevada taxa de mutações (CONNOR e HO, 1992).

O gene *env* codifica uma poliproteína de 160 KDa que sofre clivagem originando a glicoproteína de superfície gp120 e a glicoproteína transmembrana gp41 (CONNOR e HO, 1992).

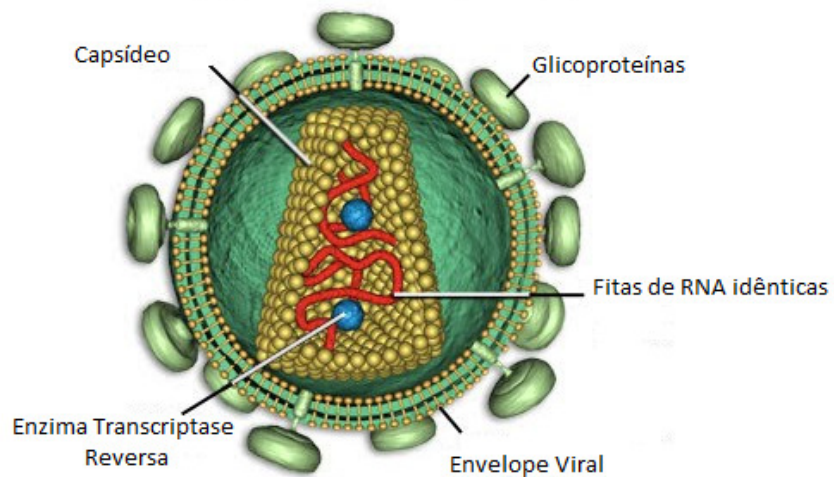


Figura 5: Esquema representativo da estrutura do Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV), evidenciando RNA viral, capsídeo, envelope, glicoproteínas de membrana e a enzima transcriptase reversa.. (Adaptado de amorporenfermagem.blogspot.com)

Enquanto intensas variações nas sequências *gag* e *pol* podem conduzir a formação de vírus inviáveis, as sequências *env* aceitam maior número de variações, muitas das quais auxiliam no escape do sistema imunológico do hospedeiro (STARICH et al., 1986).

Foram identificados dois tipos de HIV, HIV-1 e HIV-2, (BICUDO, 2006), sendo que o HIV-1 é subdividido em três grupos: M, O, e N. O grupo mais freqüente, M, é ainda subdividido em vários subtipos (A, B, C, D, F, G, H, J, K), além de formas recombinantes circulatórias (CRFs) (APETREI, 2004).

O HIV-1 e o HIV-2 estão envolvidos em diferentes padrões da doença, sendo que a infecção pelo HIV-2 é caracterizada por muito mais tempo assintomático, menor carga viral plasmática, mais lento declínio de células T CD4 e menor taxa de mortalidade por aids (SIMON et al., 1993; KANKI et al., 1994; MARLINK et al., 1994; POPPER et al., 1999; GOTTLIEB et al., 2002).

Assim, a diferença fundamental entre dois tipos de HIV reside no grau de replicação viral, e presume-se que a imunidade do hospedeiro contribui muito para o controle bem sucedido da infecção (ZHENG et al., 2004).

A coinfeção VHC/HIV acelera a velocidade de progressão de ambas as doenças, dificultando a resposta imunológica do hospedeiro. A infecção pelo VHC e o rápido curso natural da infecção, juntamente com a imunossupressão debilitação imunológica causada pelo HIV, reduz o comprometimento hepático da doença de 30 para sete anos, e aumenta o risco de evolução de cirrose e hepatocarcinoma, que é uma das causas de óbito dos pacientes com HIV (MAIER; WU, 2002; ROSADO et al., 2001).

Ainda não existem estudos que correlacionem o polimorfismo dos sistemas HPA e a coinfeção VHC/HIV, bem como, se existe influência deste polimorfismo na progressão da fibrose e na resposta ao tratamento em indivíduos coinfectados.

Referências Bibliográficas

AFDHAL, N. H.; NUNES, D. Evaluation of liver fibroses a concise review, **Am. J. Gastroenterol.**, v.99, p.1160-1174, 2004.

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

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

ANDRADE, Z.A. Regressão da fibrose hepática. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v.38, p.514-520, 2005.

APETREI, C.; MARX, P.A.; SMITH, S.M. The evolution of HIV and its consequences. **Infect. Dis. Clin. North Am.**, p.369-394, 2004.

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

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

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

BERG, T. et al. Extended treatment duration for hepatitis C virus type 1: comparing 48 versus 72 weeks of peginterferon-alfa-2a plus ribavirin. **Gastroenterol.** v.130, n.4, p.1086-1097, 2006.

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.

BICUDO, F. **Os truques do HIV**. Formas recombinantes do vírus complicam a epidemia de AIDS no Brasil. 2006. Disponível em: <<http://www.revistapesquisa.fapesp.br/?art=2909&bd=1&pg=1&lg> => Acesso em: 16 mar. 2009.

BONACINI, M. et al. Patients coinfectd with human immunodeficiency virus and hepatitis C virus demonstrate higher levels of hepatic HCV RNA. **J. Viral Hepat.**, v.6, p.203-8, 1999.

BOOTH, J.C.L.; WATERS, J.; THOMAS, H.C. Hepatitis C virus is present in CD8+ve T lymphocytes, B lymphocytes and monocytes but not in CD4+ve T lymphocytes in persistently infected patients. **Hepatol.**, v.24, p.1002, 1996.

BRASIL. Ministério da Saúde. Programa Nacional de DST e AIDS. Critérios de definição de casos de AIDS em adultos e crianças. 2004.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Hepatites virais: o Brasil está atento**. Brasília: Ministério da Saúde, 2005.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Portaria nº 34, de 28 de setembro de 2007. **Dispõe sobre protocolo clínico e diretrizes terapêuticas para a hepatite viral C**. Brasília: Ministério da Saúde, 2007.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais. **Recomendações para terapia antirretroviral em adultos infectados pelo HIV - 2008. Suplemento: Critérios para Início do Tratamento Antirretroviral**. Brasília: Ministério da Saúde, 2010.

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

BRASIL, Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde - Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais. **Boletim Epidemiológico AIDS-DST**. Brasília: Ministério da Saúde, 2012.

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

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Portaria. **Hepatites Virais em Número**. Brasília: Ministério da Saúde, 2012.

BUKH, J.; PURCELL, R.H.; MILLER, R.H. Sequence analysis of the 5' noncoding region of hepatitis C virus. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.89, p.4942-4946, 1992.

CARMO, R.A. et al. Hepatitis C virus infection among Brazilian hemophiliacs: a virological, clinical and epidemiological study. *Braz J Med Biol Res*. 2002; 35: 589-98.

CARNEIRO, M.A.S. **Estudos epidemiológicos e moleculares da infecção pelo vírus da Hepatite C em pacientes em hemodiálise no Estado de Goiás**. 2005. 17f. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Goiás, Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, Goiânia, 2005.

CHARO, I.F.; KIEFFER, N.; PHILLIPS, D.R. Platelet membrane glycoproteins. In: COLWAN, W. et al. (Eds.). – **Hemos. and Thrombosis**: Basic Principles and Clinical Practice. 3. ed. Philadelphia: Lippincott Company, 1994. p. 489-507.

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

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

COELHO, H.S.M. **Hepatites**. In: ALVES, J. G. (Ed.). **Tratamento da hepatite C crônica**. Rio de Janeiro: Sociedade de gastroenterologia do Rio de Janeiro, 2001. p.195-201.

CONNOR, R.I.; HO, D.D. Etiology of AIDS: biology of human retrovirus In: DEVITA, V.T. **AIDS: etiology, diagnosis, treatment and prevention**. Philadelphia: J. B. Lippincott Company, 1992. p.13-85.

CORMIER, E.G. et al. CD81 is na entry coreceptor for hepatitis C vírus. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, USA, v.101, p.7270-7274, 2004.

CORROA, G.; ARICOO, S. Independent and combined action of hepatitis C vírus infection and consumption on the risk of symptomaic liver-cirrhosis. **Hepatol.**, v.27, p.914-919, 1998

DEWHURST, S. **HIV-1: molecular biology**. Rochester: University of Rochester Medical Center, 1999. Disponível em: <<http://www.urms.rochester.edu/smd/mbi/grad2/hiv99b.html>> Acesso em: 16 mar. 2009.

DIETERICH, D.T.; PUROW, J.M.; RAJAPAKSA, R. Activity of combination therapy with interferon alfa-2b plus ribavirin in chronic hepatitis C patients co-infected with HIV. **Semin. Liver Dis.**, v.1, p.7-94, 1999.

DI JULIO, J. et al. Estimating the Net Contribution of Interleukin-28B Variation to Spontaneous Hepatitis C Virus Clearance. **Hepatol.**, v.53, p.1446- 1454, 2011.

DODIG, M.; TAVILL, A.S. Hepatitis C and human immunodeficiency virus coinfections. **J. Clin. Gastroenterol.**, v.33, p.367-374, 2001.

DUBUISSON, J.; PENIN, F.; MORADPOUS, D. Interaction of hepatitis C virus proteins with host cell membranes and lipids. **Trends Cell Biol.**, v.12, p.517-523, 2002.

EASL, European Association for the Study of the Liver. International Consensus Conference on Hepatitis C. Paris, 26-28, February 1999, Consensus Statement. **Jour. Hepatol.**, v.30, p.956-961, 1999.

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

ELENA, C.D.V. **Genotipificación de los sistemas de antígenos plaquetarios humanos HPA-1, -3 y 5 en donantes de sangre y Aborígenes Tobas en Rosario, Argentina.** 2007. Tese (Doutorado) - Facultad de Medicina, Universidad de Granada, Granada.

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, p.103-126, 2000.

FRANCO, S.; CLOTET, B.; MARTÍNEZ, M.A. A wide range of NS3/4^a protease catalytic efficiencies in HCV-infected individuals. **Virus Res.**, v.131, p.260-70, 2008.

FRIED, M. Peg interferon- α -2A plus ribavirin for chronic hepatitis C virus infection. **N. Engl. J. Med.**, v. 347, p.975-982, 2002.

FRIEDMAN, S.L. Liver fibrosis – from bench to bedside, **J. Hepatol.**, v.38, p.38-53, 2003.

FRIEDMAN, S.L. Mechanisms of disease: mechanisms of hepatic fibrosis and therapeutic implications. **Nature Clinical Practice. Gastroenterol. & Hepatol.**, v.1, p.98-105, 2004.

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

GABELE, E., BRENNER, D.A.; RIPPE, R.A., Liver fibrosis: signals leading to the amplification of the fibrogenic hepatic stellate cell. **Front. Biosci.**, v.8 p.69-77, 2003.

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

GOTTILIEB, G. S. et al. Equal plasma viral loads predict a similar rate of CD4⁺ T-cell decline in human immunodeficiency virus (HIV) type 1- and HIV-2-infected individuals from Senegal, West Africa. **J. Infect. Dis.**, v.185, p.905–914, 2002.

GOTTWEIN, J.M. et al. Development and characterization of hepatitis C virus genotype 1-7 cell culture systems: Role of cd81 and scavenger receptor class b type i and effect of antiviral drugs. **Hepatol.**, v.49, p.364-377, 2009.

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

GROTTO, R.M.T.. et al. Human platelet antigen (HPA) genotype is associated with therapy failure in patients infected by HCV. **J. Med. Jouri.**, 2012, no prelo.

GUOYOT, C., LEPREUX, S., COMBE, C., DOUDNIKOFF, E., BIOULAC-SAGE, P et al. Hepatic fibrosis and cirrhosis: the (myo)fibroblastic cell subpopulations involved. **Intern. J. Bioch. Cell Biol.**, v.38, p.135-51, 2006.

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

HERNANDEZ, F. et al. Autoimmune thrombocytopenia associated with hepatitis C virus infection. **Acta. Haematol.**, v.99, p.217-220.1998.

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

ITALIANO, J.E.; HARTWIG, J.H. Megakaryocyte development and platelet formation. In: MICHELSON, A. D. (Ed.). **Platelets**. California: Academic Press, 2002.

KANKI, P. J. et al. Slower heterosexual spread of HIV-2 than HIV-1. **Lancet**, v.343, p.943–946, 1994.

KITAHATA, M. M. et al. Effect of early versus deferred antiretroviral therapy for HIV on survival. **N. Engl. J. Med.**, [S.l.], v. 360, p. 1815-1826, 2009.

KUIKEN, C.; SIMMONDS, P. Nomenclature and numbering of the hepatitis C virus. **Methods mol. boil.** (Clifton) NJ v. 510, p.33-53, 2009.

LAI, M.Y.; WARE, C.F. Hepatitis C virus core protein: possible roles in viral pathogenesis. **Curr. Top. Microbiol. Immunol.**, v.242, p.117-134, 2000.

LAI, M.Y. et al. Long-term efficacy of ribavirin plus interferon alfa in the treatment of chronic hepatitis C. **Gastroenterol.** v.111, p.1307-1312, 1996.

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

LEFKOVITS, J.; PLOW, E.F.; TOPOL, E.J. Platelet glycoprotein IIb/IIIa receptors in cardiovascular medicine. **N. Engl. J. Med.**, v.332, p.1553-59, 1995.

LIN, R. et al. Interferon alfa-2b for chronic hepatitis C: effects of dose increment and duration of treatment on response rates. Results of the first multicentre Australian trial. Australia Hepatitis C Study Group. **J. Hepatol.** v.23, p.487-496, 1995.

LINDENBACH, B.D.; RICE, C.M. Flaviviridae. In: KNIPE, D.M.; HOWLEY, P.M. (Eds.). **The viruses and their replication**. Philadelphia: Fields Virology, Lippincott Williams & Wilkins, 2001. p.991-1042.

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

LIU, S. et al. Tight junction proteins claudin-1 and occluding 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, p.157-174, 2000.

LYRA, A.C.; FAN, X., DI BISCEGLIE, A. M. Molecular biology and clinical implication of hepatitis C virus. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v.37, p.691-695, 2004.

MAIER, I.; WU, G.Y. Hepatitis C and HIV co-infection: [review]. **World. J. Gastroenterol.**, v.8, p.577-579, 2002.

MAJOR, M.E.; FEINSTONE, S.M. The molecular virology of hepatitis C. **Hepatology**, v.25, p.1527-1538, 1997.

MANNS, M.P. Peginterferon alfa-2b plus ribavirin compared with interferon alfa-2b plus ribavirin for initial treatment of chronic hepatitis C: a randomised trial. **Lancet**. v. 359, p. 958-965, 2001.

MARLINK, R. et al. Reduced rate of disease development after HIV-2 infection as compared to HIV-1. **Science**, v.265, p.1587-1590, 1994.

MARRA, F. Hepatic stellate cells and the regulation of liver inflammation. **J. Hepatol.** v. 31, p.1120–1130, 1999.

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

MCLAUCHLAN, J. Properties of the hepatitis C virus core protein: a structural protein that modulates cellular processes. **J. Viral. Hepatol.**, v.7, p.2-14, 2000.

MENDES-CORREA, M.C. Prevalence of hepatitis B and C in the sera of patients with HIV infection in Sao Paulo, Brazil. **Rev Inst Med Trop São Paulo**. v.42, p.81-85, 2000.

METCALFE, P. et al. Nomenclature of human platelet antigens. **Vox Sang.** v.85, p.240-45, 2003.

MILANI, S. et al. Procollagen expression by nonparenchymal rat liver cells in experimental biliary fibrosis. **Gastroenterol.**, v.98, p.175–184, 1990.

MORROW, C.D.; PARK, J.; WAKEFIELD, J.K. Viral gene products and replication of the human immunodeficiency type 1 virus. **Am. J. Physiol.**, v.266, p.1135-1156, 1994.

MOTTA, T.Q.R. Co-infecção HIV/VHC: estudo da prevalência e da evolução clínica e mortalidade em pacientes co-infectados atendidos em Vitória, E. Santo[dissertação]. Vitória: Universidade Federal do Espírito Santo; 2003.

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

MURPHY, D. et al.. A new genotype of hepatitis C virus originating from central Africa. **Hepatol.**, v.46, p.623, 2007.

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

NAVAS, M.C. et al. Study of Dendritic cells (DC) Role in the Pathogenesis of Hepatitis C Virus (HCV) infection. **Hepatol.**, v.29, p.808A, 1998.

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

PARISE, E.R. Matriz Extracelular – Fibrogêneses. In: GAYOTTO, L.C.C.; ALVES, V.A.F. **Doenças do Fígado e Vias Biliares**. [s.l.]: Atheneu, 2001. p41-52

PAVAN, M.H. Aoki FH, Monteiro DT, Gonçalves NS, Escanhoela CA, Gonçalves Júnior FL. Viral hepatitis in patients infected with human immunodeficiency virus. **Braz J Infect Dis**. v.7, p.253-261, 2003.

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

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

PAWLOTSKY, J.M. Pathophysiology of hepatitis C virus infection and related liver disease. **Trends Microbiol.**, v.12, p.96-102, 2004.

PEARLMAN, B. L.; EHLEBEN, C.; SAIFEE, S. Treatment extension to 72 weeks of peginterferon and ribavirin in hepatitis C genotype 1-infected slow responders. **Hepatol.**, v.46, n.6, p.1688-1694, 2007.

PICELLI, et al. Human Platelet Polymorphism (HPA) in patients coinfecting HIV/HCV. **J. Med. Virol.**, 2012, no prelo.

PINZANI, M., ROMBOOTS, K. Liver fibrosis: from the bench to clinical targets. **Dig. Liver Dis.** v.36, p.231-242, 2006.

PINZANI, M.; MARRA, F. Cytokine receptors and signaling in hepatic stellate cells. **Semi. in Liver Diseases.**, v.21, p.397-416, 2001.

POPPER, S. J. et al. Lower human immunodeficiency virus (HIV) type 2 viral load reflects the difference in pathogenicity of HIV-1 and HIV-2. **J. Infect. Dis.**, v.180, p.1116–1121, 1999.

POWELL, E.E. et al. Host genetic factors influence disease progression in chronic hepatitis C. **Hepatol.**, n.31, p.828-833, 2000.

POYNARD, T. et al. Meta-analysis of interferon randomized trials in the treatment of viral hepatitis C: effects of dose and duration. **Hepatol.** v.24, p.778-789, 1996.

POYNARD, T.; BEDOSSA, P.; OPOLON, P. For the OBSVIRC, METAVIR, CLINIVIR, and DOSVIRC groups. Natural history of liver fibrosis progression in patients with chronic hepatitis C. **Lancet**. v.349, p.825-832, 1997.

POYNARD, T. et al, Randomised trial of interferon alpha2b plus ribavirin for 48 weeks or for 24 weeks versus interferon alpha2b plus placebo for 48 weeks for treatment of chronic infection with hepatitis C virus. International Hepatitis Interventional Therapy Group (IHIT). **Lancet** v.352, p.1426-1432, 1998.

POYNARD, T et al. Fibrosis in the patients with chronic hepatitis C: detection and significance. **Semin. Liver. Dis.**, v.20 (1), p. 47-55, 2000.

POYNARD, T. et al. Viral hepatitis C. **Lancet**. v.362, p.2095-2100, 2003.

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

PUOTI, M. et al. Hepatocellular carcinoma in HIV-infected patients: epidemiological features, clinical presentation and outcome. **AIDS** v.18,p.2285-2293, 2004.

PURCELL, R. The hepatitis C virus: overview. **Hepatol.**, v.26, p.115-145, 1997.

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

RELOU, I. A. M. et al. Platelet endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1) inhibits low density lipoprotein-induced signaling in platelets. **J. Biol. Chem.**, v.278, p. 32638-32644, 2003.

ROE, B.; HALL. Cellular and molecular interactions in coinfection with hepatitis C virus and human immunodeficiency virus. *Rev. in. Mol. Med.*, v.10, p.1-19, 2008.

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

ROSADO, R.R. et al. Management of hepatitis C virus in HIV-infected persons. **Antvir. Res.**, v.52, p.189-198, 2001.

SANCHEZ-TAPIAS, J. M. et al. How can we identify HCV genotype 1 patients who may benefit from an extended treatment duration with peginterferon alfa-2a (40 kd) plus RBV? **J. Hepatol.**, v.46, p.243, 2007.

SANTOSO, S. Clinical impact of platelet glycoprotein polymorphism. **Vox Sang.**, v.78, suppl 2, p.121-124, 2000.

SEEFF, L.B. Natural History of Hepatitis C. **Hepatol.**, v.26, n.3, p.21 - 28, 1997.

SEEFF, L.B. Natural history of chronic hepatitis C. **Hepatol.**, v.36, p.35-46, 2002.

SEGURADO, A.C. et al Hepatitis C virus coinfection in a cohort of HIV-infected individuals from Santos, Brazil: seroprevalence and associated factors. **AIDS Patient Care STDS**. v.18, p.135-43, 2004.

SCHEUER, P. J. Classification of chronic viral hepatitis: a need for reassessment. **J. Hepatol.** v.13, p.372-374, 1991.

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. v.1, cap.20, p.616-650.

SILVA, G.F. et al. Human Platelet Antigen (HPA) genotype is associated with fibrosis progression in Chronic Hepatitis C. **J. Med. Virol.**, v.84, p.56-60, 2012.

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. Genetic diversity and evolution of hepatitis C virus – 15 years. **J. Gen. Virol.**, v.85, p.3173-3188, 2004.

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

SIMON, F. et al. Cellular and plasma viral load in patients infected with HIV-2. **AIDS** v.7, p.1411-1417, 1993.

STARCICH, B.R. et al. Identification and characterization of conserved and variable regions in the envelope gene of HTLVIII/LAV, the retrovirus of AIDS. **Cell**, v.45, p.637-648, 1986

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

SULKOWSKI, M. S. Viral hepatitis and HIV coinfection. **J. Hepatol.**, v.48, p. 353-67, 2008.

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

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

TILLAMANN, H.L., MANNS, M.P., RUDOLPH, K.L. Merging models of hepatitis C virus pathogenesis. **Sem.Liver Dis.**, v.25, p.84-92, 2005.

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

TREITINGER, A. et al. Prevalence of serologic markers of HBV and HCV infection in seropositive patients in Florianópolis, Brazil. **Braz J Infect Dis**.v.3, p.1-5, 1999

TSUKADA, S., PARSONS, C.J., RIPPE, R.A. Mechanisms of liver fibrosis. **Clin. Chim. Acta.**, v.364.p.33-60, 2006.

VERDICHIO-MORAES, C.F. 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.

WHEN TO START CONSORTIUM et al. Timing of initiation of antiretroviral therapy in AIDS-free HIV-1-infected patients: a collaborative analysis of 18 HIV cohort studies. **Lancet**, [S.I.], v. 373, p.1352-1363, 2009.

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.

World Health Organization. Hepatitis C fact sheet. 2008 [cited 2010 Jan 04].Disponível em: http://www.who.int/immunization/topics/hepatitis_c/en/index.html.

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

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

ZEUZEM, S. et al. Peginterferon alfa- 2b plus ribavirin for treatment of chronic hepatitis C in previously untreated patients infected with HCV genotypes 2 or 3. **J. Hepatol.**, v.40, p.993-999, 2004.

ZHENG, N.N.; KIVIAT, N.B.; SOW, P.S. Comparison of Human Immunodeficiency Virus (HIV) – Specific T- Cell Responses in HIV-1 and HIV-2 – Infected Individuals in Senegal. **J. Virol.**, v.78, p.13934-13942, 2004.

ZYLBERBERG, H.; POL, S. Reciprocal interactions between human immunodeficiency virus and hepatitis C virus infections. **Clin. Infect. Dis.**, v.23, p.1117-1125, 1996.

Capítulo II

Human Platelet Polymorphism can be a genetic marker associated with HIV/HCV coinfection

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

**Title: Human Platelet Polymorphism can be a genetic marker associated with
HIV/HCV coinfection**

Running Title: HPA and coinfection HIV/HCV

ABSTRACT

AIM: To evaluate the associations of Human Platelet Antigen (HPA) polymorphisms -1, -3 and -5 with HIV/HCV coinfection. **MATERIALS AND METHODS:** In this study were included 60 HIV/HCV-coinfected patients from the Sao Paulo State health service centers. Data reported by Verdichio-Moraes et al (2009) were used as the non-infected and HCV monoinfected groups to evaluate the association of HPA -1, -3 and -5 in HIV/VHC coinfecting patients. HPA genotyping was performed in 60 HIV/HCV coinfecting patients by PCR-SSP or PCR-RFLP. HIV subtyping and HCV genotyping was performed by RT-PCR followed sequencing. The data analyses were performed using the χ^2 test or Fisher's Exact Test and the logistic regression model. **RESULTS:** HIV/HCV coinfecting patients presented HCV either genotype 1 (78.3%) or non-1 (21.7%) and HIV either subtype B (85.0%) or non-B (15%). The HPA-1a/1b genotype was more frequent ($p<0.05$) in HIV/HCV coinfection than in HCV monoinfection and the allelic frequency of HPA-5b in the HIV/HCV coinfecting patients was lower ($P<0.05$) than in HCV monoinfected cases and non-infected individuals. These data suggest that HIV presence may have influenced the interaction of HCV with platelets. On the other hand, HPA-5a/5b was more frequent ($p<0.05$) in HIV/HCV coinfecting and HCV monoinfected groups than in the non-infected individuals, suggesting that this platelet genotype is related to HCV infection, regardless of HIV presence. **CONCLUSION:** Results suggest that the HPA profile in HIV/HCV coinfecting individuals differs from the one of both HCV monoinfected and non-infected population. So, the HPA polymorphism can be a genetic marker associated with HIV/HCV coinfection.

Key-words: HIV/HCV coinfection, HPA -1, HPA -3, HPA -5, Polymorphism

INTRODUCTION

Hepatitis C is currently one of the most relevant health problems in the world, and its pathogen, Hepatitis C Virus (HCV) is known to be infecting approximately 170 million people [Lauer and Walker, 2005] of which 40% are coinfecting with Human Immunodeficiency Virus (HIV) [Dieterich, 1999]. In Brazil, the HIV/HCV coinfection ranges from 16 to 50% [Mendes-Correa et al., 2001; Pavan et al., 2003; Monteiro et al., 2004; Pereira et al., 2006] of all cases.

HIV/HCV coinfection leads to a faster evolution of both infections including more rapid progression of hepatic fibrosis [Soto et al., 1997; Benhamou et al., 1999; Graham et al., 2001] and advanced immunosuppression due to HIV disease [Fleming et al., 2003; Rauch et al., 2007].

Although different viral and environmental factors influence the HIV and HCV infections, the host's genetic polymorphisms have already been found as associated to both infections [Andrade and Andrade, 2004; Fellay, 2009]. Apart from HLA genes, other genetic polymorphisms were already described in HCV mono-infection and some of them are the alterations in TNF- α promoter [Hohler et al., 1998], hemochromatosis gene (HFE) [Gehrke et al., 2003], modifying growth factor-beta 1 (TGF- β 1) [Powell et al., 2000] and several other genes that encode cytokines [Turner et al., 1997; Ge et al., 2009]. However, genetic polymorphisms associated to Hepatitis C is not exclusively found in genes that encode proteins that are expressed in the liver tissue [Powell, 2000], which is the major target of the virus.

Despite the fact that the liver is considered the major target of the HCV infection, other cells such as B- and T-lymphocytes [Pavio and Lai, 2003] monocytes/macrophages [Muller et al., 1995] and dendritic cells [Goutagny et al., 2003] have already been seen infected by the virus. It has been reported that platelets can carry both HCV [Hamaia et al., 2001] and HIV [Lee et al., 1993]. Since platelets do not have HCV receptors, other proteins on their surface could be involved in this process. Possible candidates include the adhesion molecules denominated integrins because they have already been associated with the entry of other viruses into their target cells [Bergelson et al., 1992].

Integrins are proteins found on the platelet surface that express polymorphic segments called Human Platelet Antigens (HPA) [Bussel and Kaplan, 1998]. There

are several HPA systems but the HPA-1 to -5 [Metcalf, 2004] have been associated with platelet diseases (Muller-Eckhardt et al., 1990), myocardial infarction [Zotz et al., 2005], stroke [Reiner et al., 2000] and arterial thrombotic disease [Gonzalez-Conejero et al., 1998]. These HPA systems are biallelic [Muller-Eckhardt et al., 1990] and the polymorphism of these antigens is due to the single nucleotide substitution in the gene which, in turn, leads to the substitution of a single amino acid in the protein on the platelet surface [Metcalf et al., 2003]. The HPA -1 (bp T196C, amino acid Leu33Pro), -3 (bp T2622G, amino acid Ile843Ser), -4 (bp G526A, amino acid Arg143Gln) and -5 (bp G1648A, amino acid Glu505Lys) systems reside in integrins [Lucas and Metcalf, 2000].

Recently, a study demonstrated an association between allele HPA -5b and HCV infection in monoinfected patients [Verdichio-Moraes et al., 2009], but the role of genetic factors in HIV/HCV coinfection and the role of these factors are still little known.

In this context, the association between HPAs and HCV/HIV coinfecting patients can determine the existence of the most frequent HPA profile in coinfection. The aim of this study was to determine the frequency of HPA-1, -3 and -5 (the HPA -4b allele is very rare in Brazil) [Torales-Pereira et al., 2005] in patients coinfecting with HIV and HCV.

MATERIALS AND METHODS

Study Population

Aliquots of EDTA-anticoagulated peripheral venous blood were collected from 60 HIV/HCV-coinfecting patients from the Sao Paulo State health service centers. Inclusion criteria were the presence of HIV and HCV infections confirmed by RT-PCR. This study was approved by the Research Ethics Committee of Botucatu School of Medicine, UNESP. Data reported by Verdichio-Moraes et al. [2009] were used as the non-infected and HCV monoinfected groups [Verdichio-Moraes et al., 2009]. The characteristics of the subjects included in this study are summarized in Table I.

HIV and HCV detection

To confirm HIV and HCV infection and to perform the HCV genotyping and HIV subtyping, viral RNA was isolated from plasma using QIAamp RNA Viral Mini Kit (Qiagen, Valencia, CA, USA) and used as input in RT-PCR followed sequencing. HIV infection was confirmed using V3 loop gene according to the method of Delwart et al. [1995] while HCV infection was verified using the 5'UTR genomic region as described by Garson et al. [1990]. Samples with HCV RNA undetected in serum could not be genotyping.

HPA Genotyping

Genomic DNA was isolated from whole blood using a commercial Brasilica kit (LGC Biotecnologia, Brazil). HPA-1 and -3 were genotyped by PCR sequence-specific primers according to Klüter et al. [1996], using the C-reactive protein gene (CRP) as the internal positive control in all reactions. The HPA -5 was genotyped by PCR-restriction of fragment length polymorphism according to Kalb et al. [1994]. A negative control was performed in all PCR assays.

Data Analysis

The Hardy–Weinberg equilibrium test was carried out to evaluate the distribution of allelic frequencies of HPA-1, -3 and -5 in HIV/HCV coinfecting, HCV mono-infected and healthy groups. Initially, for the univariate analysis, it was used the χ^2 test or Fisher's Exact Test to investigate possible associations regarding HPA genotypes, alleles and HIV/HCV coinfection (software SAS for Windows v. 9.2). Later on, it was adjusted using logistic regression model when *p-value* in the univariate analysis was lower than 0.20. The level of significance for all statistical tests was set at 0.05.

RESULTS

There was no significant difference in allelic and genotypic frequencies of HPA -1 system when HIV/HCV coinfecting patients were compared to both HCV mono-infected patients and non-infected individuals (Table II and III). However, when comparing just the HIV/HCV coinfecting group and the HCV mono-infected one by

logistic regression model, the HPA -1a/1b genotype was found to be significantly more frequent in HIV/HCV coinfection ($P=0.0237$) (Table III).

There was a deviation from Hardy–Weinberg equilibrium in the HPA-5 system. The allelic frequency of HPA-5b in the HIV/HCV coinfecting patients was found to be significantly higher ($P<0.05$) than both HCV monoinfected ones and non-infected individuals (Table II and III). Although the genotypic frequency of HPA 5a/5b was found to be significantly more frequent in HIV/HCV coinfection than in the non-infected individuals, there was no significant difference in the frequency of this genotype between HIV/HCV coinfecting and HCV monoinfected patients (data not shown).

DISCUSSION

Despite the fact that genetic polymorphisms have already been described for both HCV and HIV infection [Andrade and Andrade, 2004], most studies have been done with monoinfected individuals, and the role of such polymorphism in HIV/HCV coinfecting patients are still little known.

The knowledge of genetic polymorphisms in HIV/HCV coinfecting patients is of utmost importance since HIV/HCV coinfection is quite common and when it occurs, the prognosis of both infections is worsened [Soto et al., 1997; Benhamou et al., 1999; Graham et al., 2001; Fleming et al., 2003; Rauch et al., 2007]. Hence, understanding the genetic factors related to this condition may contribute to the improvement in the assistance and/or follow-up of coinfecting individuals.

The relation between HPA system polymorphism and HCV monoinfection has already been described previously [Verdichio-Moraes et al., 2009]. HPA is expressed in platelets [Metcalfe et al., 2003], that may carry the HCV in the bloodstream [Hamaia and Allain, 2001]. Taking into consideration that fibronectin, which are adhesion molecules, have already been associated to the bonding of HCV to the platelet [Pugliese et al., 2004]. Proteins of the integrin family may as well be related to this bonding process once integrins in which HPA reside have already been described as viral receptors [Bergelson et al., 1992; Wickham et al., 1993]

In this study, HPA -1a/1b genotype was more frequent in the HIV/HCV coinfection than in the HCV monoinfection, thus suggesting that the HIV presence

may have altered the interaction of HCV and platelets that had such genotype since this frequency standard was not seen in HCV monoinfected individuals when compared to non-infected individuals.

When the HPA-5 system allele frequency was evaluated, it was noticed that there was a higher frequency of HPA-5b allele in HIV/HCV coinfecting patients if compared to both HCV monoinfected group and non-infected. Bearing in mind that the study of HPA polymorphism in other diseases have already shown that changes in the allele frequency may lead to protein structural changes and, hence, change its function [Santoso et al., 1998], the frequency change found in this study may, on the same way, suggest that HPA polymorphism may change the virus interaction with the platelets and change the transportation process. This result suggests that the HIV presence may have influenced the HCV interaction with the platelets. It still remains unknown the mechanisms through which this virus-platelet interaction change may have occurred.

On the other hand, results concerning HPA-5a/5b genotype showed no frequency difference between HCV monoinfected individuals and HIV/HCV coinfecting ones. However, both groups presented higher frequency of such genotype when compared to non-infected. These data suggest that this platelet genotype may be connected to the HCV infection, regardless of HIV presence.

In conclusion, the HPA polymorphism can be a genetic marker associated with HIV/HCV coinfection.

REFERENCES

Andrade JR, DR, Andrade DR. 2004. The Influence of the human genome on chronic viral hepatitis outcome. *Rev Inst Med trop S Paulo* 46:119-126.

Benhamou Y, Bochet M, Di Martino V, Colombet G, Thibault V, Liou A, et al. 1999. Liver fibrosis progression in human immunodeficiency virus and hepatitis C virus coinfecting patients. *The Multivirc Group Hepatol* 0:1054 1058.

Bergelson JM, Shepley MP, Chan BM, Hemler ME, Finberg RW. 1992. Identification of the integrin VLA-2 as a receptor for echovirus 1. *Scien* 255: 1718-1720.

Bussel J, Kaplan C. 1998. The fetal and neonatal consequences of maternal alloimmune thrombocytopenia (Review). *Baillieres Clin Haematol* 11:3911–3918.

Delwart EL, Herring B, Rodrigo AG, Mullins JI. 1995. Genetic subtyping of human immunodeficiency virus using a heteroduplex mobility assay. *PCR methods Appl* 4: 202-216.

Dieterich DT. 1999. Hepatitis C virus and human immunodeficiency virus: clinical issues in coinfection. *Am J Med* 107:79–84.

Fellay J. 2009. Host genome influences on HIV-1 disease. *Antivir Ther* 14: 731-738.

Fleming CA, Craven DE, Thornton D, Tumilty S, Nunes D. 2003. Hepatitis C virus and human immunodeficiency virus coinfection in an urban population: low eligibility for interferon treatment. *Clin Infect Dis* 36: 97-100.

Garson JA, Tedder RS, Briggs M, Tuke P, Glazebrook JA, Trute A, et al. 1999. Detection of hepatitis C viral sequences in blood donations by nested polymerase chain reaction and prediction of infectivity. *Lancet* 335: 1419-1422.

Ge D, Fellay J, Thompson AJ, Simon JS, Shianna KV, Urban TJ, et al. 2009. Genetic variation in IL28B predicts hepatitis C treatment-induced viral clearance. *Nature*. 461: 399-401.

Gehrke SG, Stremmel W, Mathes I, Riedel HD, Bents K, Kallinowski B. 2003. Hemochromatosis and transferrin receptor gene polymorphisms in chronic hepatitis C: impact on iron status, liver injury and HCV genotype. *J Mol Med* 81: 780-787.

Gonzalez-Conejero R, Lozano ML, Rivera J, Corral J, Iniesta JA, Moraleda JM, Vicente V. 1998. Polymorphisms of Platelet Membrane Glycoprotein Ib Associated With Arterial Thrombotic Disease. *Blood* 92: 2771-2776.

Goutagny N, Fatmi A, De Ledinghen V, Penin F, Couzigou P, Ichauspe G. 2003. Evidence of viral replication in circulating dendritic cells during hepatitis C virus infection. *J Infect Dis* 187:1951–1958.

Graham CS, Baden LR, Yu E, Mrus JM, Carnie J, Heeren T, et al. 2001. Influence of human immunodeficiency virus infection on the course of hepatitis C virus infection: a meta-analysis. *Clin Infect Dis* 33:562–569.

Hamaia S, Li C, Allain JP. 2001. The dynamics of hepatitis C virus binding to platelets and 2 mononuclear cell lines. *Blood*. 98:2293-2300.

Hohler T, Kruger A, Gerken G, Schneider PM, Meyer zum Büschenfelde KH, Rittner C. 1998. Tumor necrosis factor alpha promoter polymorphism at position –238 is associated with chronic active hepatitis C infection. *J med Virol* 54: 173-177.

Kalb R, Santoso S, Unkelbach K, Kiefel V, Mueller-Eckhardt C. 1994. Localization of the Br polymorphism on a 144bp exon of the GPIa gene and its application for platelet DNA typing. *Thromb Haemost* 71: 651–654.

Klüter H, Fehla K, Panzer S, Kirchner H, Bein G. 1996. Rapid typing for human platelet antigen systems-1, -2, -3 and -5 by PCR amplification with sequence-specific primers. *Vox Sang* 71:121–125.

Lauer GM, Walker BD. 2001. Hepatitis C virus infection. *N Engl J Med* 345: 41-52.

Lee TH, Stromberg RR, Henrard D, Busch MP. 1993. Effect of platelet-associated virus on assays of HIV-1 in plasma. *Science*. 262:1585-1586.

Lucas GF, Metcalfe P. 2000. Platelet and granulocyte polymorphisms. *Transfus Med* 10:157-174.

Mendes-Correa MC, Barone AA, Guastini C. 2001. Hepatitis C virus seroprevalence and risk factors among patients with HIV infection. *Rev Inst Med Trop* 43:15–19.

Metcalfe P. 2004. Platelet antigens and antibody detection. *Vox Sang* 87 : 82-86.

Metcalfe P, Watkins NA, Ouwehand WH, Kaplan C, Newman P, Kekomaki R, et al. 2006. Nomenclature of human platelet antigens. *Vox Sang* 85:240–245.

Monteiro MR, Nascimento MM, Passos AD, Figueiredo JF. 2004. Hepatitis C: prevalence and risk factors among patients with HIV/AIDS in Belem Para, in Brazilian Amazon. *Rev Soc Bras Med Trop* 37: 40–46.

Muller-Eckhardt C, Kiefel V, Santoso S. 1999. Review and update of platelet alloantigen systems. *Transfus Med* 4: 98.

Muller HM, Pfaff E, Goeser T, Kallinowski B, Solbach C, Theilmann L. 1995. Peripheral blood leukocytes serve as a possible extra hepatic site for hepatitis C virus replication. *J Gen Virol* 74: 669-676.

Pavan MH, Aoki FH, Monteiro DT, Gonçalves NS, Escanhoela CA, Gonçalves Jr FL, et al. 2003. Viral hepatitis in patients infected with human immunodeficiency virus. *Braz J Infect Dis* 7: 253–261.

Pavio N, Lai MMC. 2003. The hepatitis C virus persistence: how to evade the immune system. *J Biosci* 28: 287-304.

Pereira GA, Stefani MM, Martelli CM, Turchi MD, Siqueira EM, Carneiro MA, et al. 2006. Human immunodeficiency virus type 1 and hepatitis C virus co-infection and viral subtypes at an HIV testing center in Brazil. *J Med Virol* 78: 719–723.

Powell EE, Edwards-Smith CJ, Hay JL, Clouston AD, Crawford DH, Shorthouse C, et al. 2000. Host genetic factors influence disease progression in chronic hepatitis C. *Hepatology* 31: 828-833.

Pugliese A, Gennero L, Cutufia M, Enrietto M, Morra E, Pescarmona P, et al. 2004. HCV infective virions can be carried by human platelets. *Cell Biochem Funct* 22:353-358.

Rauch A, Laird R, McKinnon E, Telenti A, Furrer H, Weber R, Smillie D, Gaudieri S. 2007. Influence of inhibitory killer immunoglobulin-like receptors and their HLA-C ligands on resolving hepatitis C virus infection. *Tissue Antigens* 69: 237-240.

Reiner AP, Kumar PN, Schwartz SM, Longstreth WT Jr, Pearce RM, Rosendaal FR, Psaty BM, Siscovick DS. 2000. Genetic variants of platelet glycoprotein receptors and risk of stroke in young women. *Stroke* 31:1628–3163.

Santoso S, Kiefel V. 1998. Human platelet-specific alloantigens: update. *Vox Sang* 74: 249-253.

Soto B, Sanchez-Quijano A, Rodrigo L, del Olmo JA, Garcia-. Bengoechea M, Hernandez-Quero J et al. 1997. Human immunodeficiency virus infection modifies the natural history of chronic parenterally-acquired hepatitis C with an unusually rapid progression to cirrhosis. *J Hepatology* 26:1–5.

Toralles-Pereira C, Pardini MIMC, Deffune E, Machado PEA. 2005. The first report of the allele HPA-4b in a Brazilian. *Int J Immunogenet* 32:165-166.

Turner DM, Williams DM, Sankaran D, Lazarus M, Sinnott PJ, Hutchinson IV. 1997. An investigation of polymorphism in the interleukin-10 gene promoter. *Europ J Immunogenet* 24: 1-8.

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

Wickham TJ, Mathias P, Cheres DA, Nemerow GR. 1993. Integrins alpha v beta 3 and alpha v beta 5 promote adenovirus internalization but not virus attachment. *Cell* 73: 309-319.

Zotz RB, Winkelmann BR, Müller C, Boehm BO, März W, Scharf RE. 2005. Association of polymorphisms of platelet membrane integrins alpha IIb(beta)3 (HPA-1b/PI) and alpha2(beta)1 (alpha807TT) with premature myocardial infarction. *J Thromb Haemost* 3:1522-1529.

Tables:**Table I:** Demographic and virological characteristics of HIV/HCV coinfectd patients, HCV monoinfected patients and Non-infected.

	HIV/HCV Coinfectd	HCV Monoinfected	Non-infected ^[34]
Characteristics	patients (N = 60)	patients ^[34] (N = 191)	(N=257)
Age, years [median (IQR)]	38.1 (35-41.25)	44.8 (36-52)	34.0 (27-40)
Sex, Male [N (%)]	40 (66.67)	134 (70.16)	191 (74.32)
HCV Genotype [N (%)]			
Genotype 1	47 (78.3)	110 (57.6)	Non applicable
Genotype non-1 (2 or 3)	13 (21.7)	69 (36.1)	Non applicable
Non-genotyped**	0 (00.0)	12 (6.3)	Non applicable
HIV Subtype [N (%)]			
Subtype B (B pure)	51 (85.0)	Non applicable	Non applicable
Subtype non-B (F or BF recombinant)	09 (15.0)	Non applicable	Non applicable

Table II: Allelic and Genotypes Frequencies for HPA-1, -3 and -5 in HIV/HCV coinfectd patients (n=60) compared with HCV monoinfected patients (n=191) and Non-infected (n=257).

	HIV/HCV-coinfectd (%)	HCV-infected (%)	Non-infected (%)	<i>p value</i>
Alleles				
1a	101 (84.17)	337 (88.21)	436 (84.82)	0.2839
1b	19 (15.83)	45 (11.78)	78 (15.18)	
3a	89 (74.17)	268 (70.15)	340 (66.14)	0.1687
3b	31 (25.83)	114 (29.84)	174 (33.86)	
5a	101 (84.17)	329 (86.12)	467 (90.85)	0.0266
5b	19 (15.83)	53 (13.88)	47 (9.14)	
Genotypes				
1a/1a	42 (70.00)	154 (80.63)	188 (73.20)	0.1165
1a/1b	17 (28.33)	29 (15.18)	60 (23.20)	
1b/1b	01 (1.67)	8 (4.19)	9 (3.50)	
3a/3a	35 (58.33)	103 (53.93)	119 (46.30)	0.3472
3a/3b	19 (31.67)	62 (32.46)	102 (39.70)	
3b/3b	06 (10.00)	26 (13.61)	36 (14.00)	
5a/5a	41 (68.33)	139 (72.77)	212 (82.50)	0.0211
5a/5b	19 (31.77)	51 (26.7)	43 (16.70)	
5b/5b	0 (00.00)	1 (0.53)	2 (0.80)	

Table III: Influence of the HPA -1a/1b genotype and HPA -5b allele in HIV/HCV coinfectd patients in relation to HCV monoinfected and Non-infected – Binomial Logistic Regression Model, confidence interval of 95%.

HPA -1a/1b genotype	χ^2	<i>p-value</i>
HIV/HCV Coinfected versus Non-infected	0.66	0.4182
HIV/HCV Coinfected versus HCV Monoinfected	5.11	0.0237
HPA -5b allele		
HIV/HCV Coinfected versus Non-infected	11.10	0.0009
HIV/HCV Coinfected versus HCV Monoinfected	14.72	0.0001

Capítulo III

**AVALIAÇÃO DO POLIMORFISMO HPA DOS
SISTEMAS HPA-1, -3 E -5, NA PROGRESSÃO DA
FIBROSE EM PACIENTES COINFECTADOS VHC/HIV.**

Artigo será submetido para publicação em um periódico de circulação internacional

AVALIAÇÃO DO POLIMORFISMO HPA DOS SISTEMAS HPA-1, -3 E -5, NA PROGRESSÃO DA FIBROSE EM PACIENTES COINFECTADOS VHC/HIV.

RESUMO

Além de fatores virais e do hospedeiro a progressão da fibrose hepática resultante da infecção pelo Vírus da Hepatite C (VHC) tem sido relacionada a polimorfismos genéticos do hospedeiro. Nesta linha, recentemente polimorfismos dos Antígenos Plaquetários Humanos (HPA) foram associados à progressão para fibrose em pacientes monoinfectados pelo VHC. Alguns destes antígenos HPA residem em proteínas da família das integrinas, cuja expressão, também, já foi associada à progressão da fibrose hepática. No entanto, estudos relacionando polimorfismos genéticos do hospedeiro em pacientes coinfectados com o VHC e o Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) são raros e, não há nenhum estudo relacionando polimorfismos HPA com progressão para fibrose. Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar possíveis associações dos polimorfismos dos sistemas HPA-1, -3 e -5, que residem em integrinas, na progressão da fibrose hepática em indivíduos coinfectados VHC/HIV. DNA Genômico de 56 pacientes coinfectados VHC/HIV foi utilizado como fonte para genotipagem dos sistemas HPA -1 e -3 por PCR-SSP, e HPA -5 por PCR-RFLP. Progressão da fibrose foi avaliada utilizando o escore de METAVIR, sendo constituídos dois grupos: Grupo 1 (G1): pacientes coinfectados VHC/HIV com baixo grau de fibrose (F1, fibrose portal sem septos ou F2, com poucos septos) e Grupo 2 (G2): pacientes coinfectados VHC/HIV com fibrose avançada (F3, numerosos septos ou F4, cirrose). Um grupo controle, do estudo de Silva e colaboradores (2012), constituído por pacientes monoinfectados pelo VHC com baixo grau de fibrose (F1 ou F2) e fibrose avançada (F3 ou F4) foi utilizado para as análises realizadas neste estudo. O Teste Exato de Fisher foi utilizado para avaliar possíveis associações entre o polimorfismo dos sistemas HPA -1, -3 e -5 e a progressão para fibrose, utilizando um nível de significância de 5%. Não houve desvio do equilíbrio de *Hardy–Weinberg* em todos os sistemas HPA avaliados. Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas na distribuição de frequências alélicas e genotípicas dos sistemas HPA estudados entre G1 e G2, mostrando que, na coinfecção VHC/HIV, a associação do polimorfismo HPA com

progressão para fibrose, observada no monoinfectado VHC, é perdida, sugerindo que a presença do HIV afeta, de alguma forma, esta associação.

INTRODUÇÃO

A infecção pelo Vírus da Hepatite C (VHC) constitui um problema de saúde pública e, o (STRAUSS, 2001) comprometimento hepático pode ocorrer gradativamente a medida que a fibrose evolui, caracterizada pelo acúmulo progressivo de matriz extracelular (MEC) no fígado (FATTOVICH, et al. 1997).

A progressão da fibrose se encontra na dependência de diferentes fatores virais e, do hospedeiro. Sexo, idade à infecção, consumo de álcool, coinfeção com o Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) e Vírus da Hepatite B (VHB) já foram associados à progressão da fibrose (POYNARD et al., 2001, FREEMAN et al., 2001; SEEF, 2002). Da mesma forma, fatores genéticos do hospedeiro também vêm sendo relacionados a esta progressão. Além do Antígeno Leucocitário Humano (HLA), outros polimorfismos genéticos como no gene da interleucina 10 (IL-10), fator de necrose tumoral (TNF- α), angiotensinogênio, fator de crescimento transformante β 1 (TGF- β 1) já foram associados à progressão da fibrose em pacientes monoinfectados pelo VHC (POWELL et al., 2000). Na mesma linha a expressão de algumas integrinas também tem sido relacionada à evolução da fibrose (NEJARI et al., 2001; POPOV et al., 2008).

As integrinas são proteínas transmembranas heterodiméricas (CARLONI, et al., 1996), que estão presentes em vários tipos celulares, incluindo as plaquetas (TAKADA, 2007) e células estreladas do fígado (RACINE-SAMSON et al., 1997. GAO; BRIGSTOCK, 2004).

As integrinas presentes na membrana plaquetária, expressam vários tipos de antígenos em sua superfície, dentre os quais tem recebido considerável destaque os antígenos plaquetários humanos, do inglês, *Human Platelet Antigens* (HPA) (SCHOROEDER; RAYNER, 1993). Existem vários sistemas HPA, dentre os quais os mais estudados que residem em integrinas são o HPA -1, -3, -4 e -5 (METCALFE et al., 2003).

Os antígenos HPA são polimórficos na população e, 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 (LUCAS; METCALFE, 2000; METCALFE et al., 2003). O polimorfismo de alguns sistemas HPA já foi associado a doenças envolvendo plaquetas (MULLER-ECJHARDT et al., 1990) e, também a desordens que não envolvem distúrbios plaquetários como anemia falciforme (CASTRO et al., 2004), infarto do miocárdio (ROSENBERG et al., 2002), e trombose venosa (RIDKER et al., 1997). Nos últimos anos, o polimorfismo HPA, também, tem sido associado a infecções virais como infecção pelo vírus da dengue (SOUNDRAVALLY; HOTI, 2007) e, pelo Vírus da Hepatite C em monoinfectados (VERDICHIO-MORAES et al., 2009) e coinfectados VHC/HIV (PICELLI, et al., no prelo).

Nesta mesma linha, um estudo recente demonstrou uma associação do genótipo HPA -1a/1b com a evolução da fibrose em pacientes monoinfectados pelo VHC (SILVA et al., 2012). No entanto, não existem, ainda, na literatura científica mundial estudos que avaliem a associação do polimorfismo HPA com a progressão para a fibrose em pacientes coinfectados VHC/HIV e, embora, a influência dos fatores genéticos do hospedeiro já tenha sido bem documentada na infecção pelo VHC e na evolução da fibrose hepática, esses estudos apresentam como foco principal, pacientes monoinfectados pelo VHC.

Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar possíveis associações dos polimorfismos dos sistemas HPA-1, -3 e -5 [o alelo HPA -4b é raro no Brasil (TORALLES-PEREIRA et al., 2005)], na progressão da fibrose hepática em indivíduos coinfectados VHC/HIV.

CASUÍSTICA E MÉTODOS

Participaram deste estudo 36 pacientes coinfectados VHC/HIV, atendidos no SAE de Infectologia “Domingos Alves Meira” – FAMESP, e no Ambulatório de Hepatites da Disciplina de Gastroenterologia Clínica do Departamento de Clínica Médica, da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP.

Foram incluídos nesse estudo pacientes maiores de 18 anos, que tenham realizado biópsia hepática, com coinfeção VHC/HIV comprovada por técnicas de Biologia Molecular, não portadores de doenças hepáticas e qualquer outra etiologia, e que forneceram seu consentimento livre e esclarecido por escrito. Também foram incluídos pacientes já falecidos que possuíam material excedente da rotina armazenado no repositório do Laboratório de Biologia Molecular do Hemocentro, procedimento autorizado pelo Comitê de Ética e Pesquisa da Faculdade de Medicina de Botucatu, Unesp.

Para as análises foram utilizados dois grupos de acordo com o grau de fibrose determinado pela biópsia hepática, a qual foi realizada utilizando agulha *Menghini* ou *Tru-Cut*. Os fragmentos foram analisados quando pelo menos oito espaços portais estavam presentes. O tecido foi submetido a coloração hematoxilina-eosina, tricromo Masson e reticulina. As biópsias foram analisadas por um patologista, utilizando o sistema METAVIR de classificação (POYNARD et al., 1997). Os grupos constituídos foram Grupo 1 (G1): pacientes coinfectados VHC/HIV com baixo grau de fibrose (F1, fibrose portal sem septos ou F2, com poucos septos) e Grupo 2 (G2): pacientes coinfectados VHC/HIV com fibrose avançada (F3, numerosos septos ou F4, cirrose).

Os pacientes também foram classificados de acordo com o genótipo VHC circulante em genótipo 1 e não 1 (genótipo 2 ou 3) e; subtipo HIV em B e não B (qualquer outro subtipo diferente de B). Parâmetros como idade, sexo, tempo de infecção, definido como tempo entre a provável data da infecção e a data da biópsia (parâmetro avaliado para 27 dos 36 pacientes estudados), consumo de álcool, definido como superior a 40g/dia para mulheres e 80g/dia para homens (parâmetro avaliado para 29 dos 36 pacientes). Todos estes dados foram retirados dos prontuários médicos dos pacientes incluídos no estudo.

Para confirmar a coinfeção dos vírus do HIV e VHC foram realizadas genotipagem do VHC e subtipagem do HIV. RNA viral foi isolado do plasma usando *QIAamp RNA Viral Mini Kit* (Qiagen, Valencia, CA, USA) e utilizado como fonte para RT-PCR seguida de seqüenciamento. A infecção pelo HIV foi confirmada usando o gene da alça V3 de acordo com o método de Delwart et al. 1995, enquanto anti-VHC foi verificada usando a região genômica 5'UTR conforme descrito por Garson et al. 1990.

DNA genômico foi isolado a partir de sangue total usando o kit comercial *Axy Prep Blood Genomic DNA Miniprep Kit* (*Axygen Scientific, Inc, Union City, CA, USA*) e, utilizado para genotipagem HPA-1 e -3 por PCR-SSP de acordo com Kluter et al (1996), e HPA -5 por PCR-RFLP de acordo com Kalb et al (1994).

Equilíbrio de *Hardy-Weinberg* foi usado para verificar a distribuição das frequências alélicas dos HPA -1, -3 e -5 de acordo com o grau de fibrose. O Teste Exato de Fisher foi utilizado para investigar possíveis associações entre as frequências alélicas e genotípicas dos HPA -1, -3 e -5 de acordo com o grau de fibrose entre pacientes coinfectados VHC/HIV e monoinfectados VHC. O nível de significância estatístico utilizado em todos os testes foi de 0,05.

RESULTADOS

Dos 36 pacientes incluídos neste estudo, 26 (72,22%) eram do sexo masculino, com idade média de 44,19 anos e média de tempo de infecção de 13,4 anos (parâmetro avaliado para 27 dos 36 casos devido à ausência de informações sobre a data provável da infecção para nove pacientes). Dos 36 pacientes incluídos no estudo, 33 (91,66%) eram portadores de genótipo 1 do VHC, 03 (8,34%) não 1 (2 ou 3). Quanto ao subtipo HIV, 32 (88,90%) eram do subtipo B e 02 (5,55%) não B (F ou recombinante BF), 02 amostras não foram subtipadas para o HIV devido a limitações da técnica empregada (Tabela I).

Quanto ao grau de fibrose, 23 (63,89%) dos pacientes foram incluídos em G1 (F1 ou F2) e, 13 (36,11%) em G2 (F3 ou F4). O uso abusivo de álcool foi observado em 15 (31,91%) dos 47 pacientes avaliados para este parâmetro (dado não mostrado)

Tabela I: Características demográficas e virológicas dos pacientes coinfectados VHC/HIV incluídos no estudo (n=36).

Características	Pacientes Coinfectados VHC/HIV (N = 36)
Idade, anos [média (IQR)]	44,19 (38,75-49,25)
Sexo, Masculino [N (%)]	26 (72,22)
Genótipo VHC [N (%)]	
Genótipo 1	33 (91,66)
Genotipo não-1 (2 ou 3)	03 (08,34)
Subtipo HIV [N (%)]	
Subtipo B (B puro)	32 (88,90)
Subtipo não-B (F ou BF recombinantes)	02 (05,55)
Não subtipados	02 (05,55)
Fibrose [N (%)]	
G1 (F1-F2)	23 (63,89)
G2 (F3-F4)	13 (36,11)

VHC: Vírus da Hepatite C; HIV: Vírus da Imunodeficiência Humana; IQR: Intervalo Interquartil

Não houve desvio do equilíbrio de *Hardy–Weinberg* em todos os sistemas HPA avaliados. Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas na distribuição de freqüências alélicas e genotípicas dos sistemas HPA estudados entre G1 (F1 ou F2) e G2 (F3 ou F4) entre pacientes coinfectados VHC/HIV (Tabela II).

Tabela II: Frequência Alélica e Genotípica dos HPA-1, -3 e -5 em pacientes coinfectados VHC/HIV (n=36) nos grupos G1 (F1 e F2) , e G2 (F3 e F4).

<i>Fibrose</i>	<i>G1 (n=23)</i>	<i>G2 (n=13)</i>	<i>p- value</i>
Alelos			
1a	36	22	$p= 0,5129$
1b	10	04	
3a	28	20	$p= 0,1652$
3b	18	06	
5a	42	25	$p= 0,4369$
5b	04	01	
Genótipos			
1a/1a	14	10	$p= 0,4296$
1a/1b	08	02	
1b/1b	01	01	
3a/3a	08	08	$p=0,4262$
3a/3b	12	04	
3b/3b	03	01	
5a/5a	19	12	$p= 0,6336$
5a/5b	04	01	

Nenhum genótipo HPA -5a/5b foi encontrado na população estudada. Análise realizada pelo Teste Exato de Fisher.

DISCUSSÃO

A progressão da fibrose hepática na infecção pelo Vírus da Hepatite C (VHC) já foi associada a fatores como, sexo, ingestão de álcool, idade e idade à infecção (POYNARD et al., 2000; FREEMAN et al., 2001; SEEF et al., 2002). Fatores genéticos também já foram relacionados a evolução do processo fibrótico no fígado infectado pelo vírus (POWELL, 2000).

O desenvolvimento da fibrose ocorre, principalmente, pela atividade das células estreladas do fígado (GABELE et al., 2003; FRIEDMAN, 2003) e, a ativação destas células já foi relacionada a regulação por proteínas da família das integrinas (NEJARI et al., 2001; POPOV et al., 2008), algumas das quais são expressas nas células estreladas hepáticas (RACINE-SAMSON et al., 1997. GAO; BRIGSTOCK, 2004). Desta forma, modificações conformacionais em integrinas podem alterar o desenvolvimento e a progressão da fibrose.

Nas integrinas residem alguns antígenos polimórficos, os HPA -1, -3 e -5 e, o polimorfismo destes antígenos pode modificar a estrutura tridimensional da proteína e, dessa forma interferir na progressão para fibrose.

Nesta linha, um estudo já demonstrou que, em pacientes monoinfectados pelo VHC, o genótipo HPA -1a/1b se relaciona a progressão mais rápida para fibrose e, consequentemente menor é o tempo para o processo fibrótico atingir níveis F3 ou F4 (SILVA et al., 2012).

No entanto, este estudo, bem como outros estudos que correlacionam outros fatores genéticos à progressão para fibrose foram realizados em pacientes monoinfectados pelo VHC, sendo que este estudo é pioneiro na investigação da associação do polimorfismo HPA e progressão para fibrose em coinfectados VHC/HIV. Os resultados aqui obtidos diferem do obtido por Silva e colaboradores (2012) e sugerem que o polimorfismo HPA não se correlaciona à progressão da fibrose em coinfectados VHC/HIV.

Os resultados aqui obtidos mostram que, de alguma forma, na coinfecção VHC/HIV a associação do polimorfismo HPA é perdida, sugerindo que a presença do HIV pode afetar esta associação.

Arthos e colaboradores (2008) demonstraram que o HIV interage com integrinas na superfície celular do linfócito T no início da infecção, evidenciando que o HIV apresenta afinidade com proteínas da família das integrinas. Nesta linha de

raciocínio, pode-se sugerir que o HIV tendo afinidade por integrinas, poderia associar-se a estas moléculas, constituindo um obstáculo a interação VHC com integrinas nas células estreladas do fígado e, a associação do HPA com a progressão para fibrose observada em monoinfectados VHC pode ter sido perdida pela presença do HIV, hipótese que deve ser investigada com a realização de novos estudos nesta linha de pesquisa.

REFERÊNCIAS

ARTHOS, J. et al. HIV-1 envelope protein binds to and signals through integrin $\alpha 4\beta 7$, the gut mucosal homing receptor for peripheral T cells. **Nature Immunol.**, v.9,p. 301-309, 2008.

CARLONI, V.; ROMANELLI, R.G.; PINZANI, M. et al. Expression and function of integrins receptors for collagen and laminin in culture human hepatic stellate cells. **Gastroenterol.**, v.110, p.1127-1136, 1996.

CASTRO, V. et al. Polymorphism of the human platelet antigen-5 system is a risk factor for occlusive vascular complications in patients with sickle cell anemia. **Vox Sang.**, v.87, p.118-123, 2004.

DELWART, E.L. et al. Genetic subtyping of human immunodeficiency virus using a heteroduplex mobility assay. **PCR methods Appl.**, v.4, p.202-216, 1995.

FATTOVICH, G. et al. Morbidity and Mortality in compensated cirrhosis type C: a retrospective follow-up study of 384 patients. **Gastroenterol.**, v.112, p.463-472, 1997.

FREEMAN, A.J.; DORE, G.J.; LAW, M.G. et al. Estimating progression to cirrhosis in chronic hepatitis C virus infection. **Hepatol.**, v.34, p.809-816, 2001.

FRIEDMAN, S.L. Liver fibrosis – from bench to bedside, **J. Hepatol.**, v.38, p.38-53, 2003.

GABELE, E., BRENNER, D.A.; RIPPE, R.A., Liver fibrosis: signals leading to the amplification of the fibrogenic hepatic stellate cell. **Front. Biosci.**, v.8 p.69-77, 2003.

GAO, R.; BRIGSTOCK, D.R. Connective tissue growth factor (CCN2) induces adhesion of rat activated hepatic stellate cells by binding of its C-terminal domain to integrin alpha(v) beta(3) and heparin sulfate proteoglycan. **J Biol Chem.**, v.279, p.8848-8855, 2004.

GARSON, J.A. et al. Detection of hepatitis C viral sequences in blood donations by nested polymerase chain reaction and prediction of infectivity. **Lancet**, v.335, p.1419-1422, 1999.

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, p.651-654, 1994.

KLUTER, H. et al. Rapid typing for human platelet antigen systems-1, -2, -3 and -5 by PCR amplification with sequence-specific primers. **Vox Sang.**, v.71, p.121-125, 1996.

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

METCALFE, P. et al. Nomenclature of human platelet antigens. **Vox Sang.**, v.85, p.240-45, 2003.

MULLER-ECKHARDT, C.; KIEFEL, V.; SANTOSO, S. Review and update of platelet alloantigen systems. **Transfus. Med.**, v.4, p.98, 1999.

NEJARI, M. et al. Integrin up-regulation in chronic liver disease: Relationship with inflammation and fibrosis in chronic hepatitis C. **J Pathol.**, v.195, p.473-481, 2001.

PICELLI, et al. Human Platelet Polymorphism (HPA) in patients coinfectd HIV/HCV. **J. Med. Virol.**, 2012, no prelo.

POPOV, Y.; PATSENKER, E.; STICKEL, F. et al. Integrin $\alpha\beta 6$ is a marker of the progression of biliary and portal liver fibrosis and a novel target for antifibrotic therapies. **J Hepatol.**, v.48, p.453-464, 2008.

POYNARD, T.; BEDOSSA, P.; OPOLON, P. For the OBSVIRC, METAVIR, CLINIVIR, and DOSVIRC groups. Natural history of liver fibrosis progression in patients with chronic hepatitis C. **Lancet.** v.349, p.825-832, 1997.

POYNARD, T.; RATZIU, V.; CHARLOTTE, F. et al. Rates and risk factors of liver fibrosis progression in patients with chronic hepatitis C. **J Hepatol.**, v.34, p.730-739, 2001.

POWELL, E.E. et al. Host genetic factors influence disease progression in chronic hepatitis C. **Hepatol.**, n.31, p.828-833, 2000.

RACINE-SAMSON, L.; ROCKEY, D.C.; BISSELL, D.M. The role of $\alpha 5 \beta 1$ integrin in wound contraction. A quantitative analysis of liver myofibroblasts in vivo and in primary culture. **J Biol Chem.**, v.272, p. 30911-30917, 1997.

RIDKER, P.M. et al. PIA1/A2 polymorphism of platelet glycoprotein IIIa and risks of myocardial infarction, stroke and venous thrombosis. **Lancet**, v.349: p.385–388, 1997.

ROSENBERG, N. et al. Effects of platelet membrane glycoprotein polymorphisms on the risk of myocardial infarction in young males. **IMAJ.** v.4, p.411-414, 2002.

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

SEEF, L.B. Natural history of chronic hepatitis C. **Hepatol.**, v.36, p.35-46, 2002.

SILVA, G.F. et al. Human Platelet Antigen (HPA) genotype is associated with fibrosis progression in Chronic Hepatitis C. **J. Med. Virol.**, v.84, p.56-60, 2012.

SOUNDRAVALLY, R.; HOTI, S.L. Immunopathogenesis of dengue hemorrhagic fever and shock syndrome: Role of TAP and HPA gene polymorphism. **Human Immunol.**, v.68,p.973-979, 2007.

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

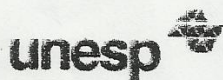
TAKADA, Y.; SIMON S. Protein family review: The integrins. **Genome Biol.**, v.8, p.215 -219, 2007

TORALLES-PEREIRA, C. et al. The first report of the allele HPA-4b in a Brazilian. **Int. J. Immuno.**, v.32, p.165-166. 2005.

VERDICHIO-MORAES, C.F. 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.

Documentos anexos

ANEXO I



Universidade Estadual Paulista
Faculdade de Medicina de Botucatu

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



Registrado no Ministério da Saúde
em 30 de abril de 1997

Botucatu, 06 de Dezembro de 2010.

Of. 572/10-CEP

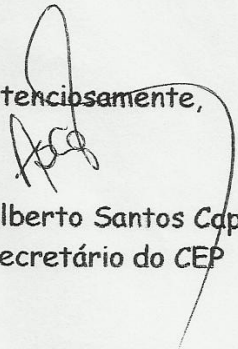
Ilustríssima Senhora
Profª Drª Maria Inês de Moura Pardini
Divisão de Hemocentro da
Faculdade de Medicina de Botucatu

Prezada Drª. Maria Inês,

De ordem do Senhor Coordenador deste CEP, informo que Projeto de Pesquisa (**Protocolo CEP 3750-2010**) Progressão da fibrose e a resposta à terapêutica antiviral na coinfeção VHC/HIV: avaliação do polimorfismo do sistema HPA-1, a ser conduzido por Natália Picelli, orientada por Vossa Senhoria, com a colaboração dos Drs. Giovanni Faria Silva, Rejane Maria Tommasini Grotto e Silvia Maria Corvino, recebeu do relator **parecer favorável** aprovado em reunião de 06 de dezembro de 2010.

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

Atenciosamente,


Alberto Santos Capelluppi
Secretário do CEP

ANEXO II



Universidade Estadual Paulista
Faculdade de Medicina de Botucatu

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



Registrado no Ministério da Saúde
em 30 de abril de 1997

Botucatu, 04 de abril de 2012

Of. 160/2012

Ilustríssima Senhora
Profª Drª Maria Inês de Moura Pardini
Divisão de Hemocentro da
Faculdade de Medicina de Botucatu

Prezada Drª. Maria Inês,

Com referência ao Projeto de Pesquisa (Protocolo CEP 3750-2010) Progressão da fibrose e a resposta à terapêutica antiviral na coinfeção VHC/HIV: avaliação do polimorfismo do sistema HPA-1, a ser conduzido por Natália Picelli, orientada por Vossa Senhoria, com a colaboração dos Drs. Giovanni Faria Silva, Rejane Maria Tommasini Grotto e Silvia Maria Corvino, aprovado em reunião de 06 de dezembro de 2010 informo:

Fica autorizado à partir desta data (04/04/12) as seguintes alterações ao projeto originalmente proposto:

- Ampliação do escopo do Projeto para avaliação do polimorfismo dos sistemas HPA-3 e 5;
- Inclusão na casuística de pacientes provenientes do Hospital Dia "Dr. Domingos Alves Meira" sobre a responsabilidade do Dr. Alexandre Naime Babosa;
- Fica autorizado a utilização de plasma excedente da rotina laboratorial, estocado no Laboratório de Biologia Molecular do hemocentro, dos pacientes falecidos;

Com as alterações acima o Projeto de Pesquisa passa a ter a seguinte nomenclatura "Progressão da fibrose e a resposta à terapêutica antiviral na coinfeção VHC/HIV: avaliação do polimorfismo do sistema HPA-1, 3 e 5".

Atenciosamente,

Prof. Dr. Trajano Sardenberg
Coordenador do CEP