



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



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FISIOPATOLOGIA EM  
CLÍNICA MÉDICA

Aline Aki Tanikawa

**Avaliação dos fatores de crescimento TGF- $\beta$ 1 e  
PDGF na progressão da fibrose hepática em  
pacientes cronicamente infectados pelo Vírus da  
Hepatite C**

BOTUCATU

2015

Aline Aki Tanikawa

**Avaliação dos fatores de crescimento TGF- $\beta$ 1 e  
PDGF na progressão da fibrose hepática em  
pacientes cronicamente infectados pelo Vírus da  
Hepatite C**

Tese apresentada à Faculdade de  
Medicina, Universidade Estadual  
Paulista “Júlio de Mesquita Filho”,  
Câmpus de Botucatu, para  
obtenção do título de Doutora em  
Fisiopatologia em Clínica Médica.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup>. Maria Inês de Moura Campos Pardini

Coorientadora: Prof.<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup>. Rejane Maria Tommasini Grotto

BOTUCATU

2015

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.  
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP  
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Tanikawa, Aline Aki.

Avaliação dos fatores de crescimento TGF- $\beta$ 1 e PDGF na progressão da fibrose hepática em pacientes cronicamente infectados pelo vírus da hepatite C / Aline Aki Tanikawa. - Botucatu, 2015

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de Botucatu  
Orientador: Maria Inês de Moura Campos Pardini  
Coorientador: Rejane Maria Tommasini Grotto  
Capes: 20804008

1. Hepatite por vírus. 2. Hepatite C. 3. Fígado - Doenças.  
4. Plaquetas (Sangue).

Palavras-chave: Fibrose hepática; PDGF; Plaquetas; TGF-beta;  
Vírus da Hepatite C.

*Dedicatória*

---

*Aos meus pais, Toshimasa e  
Fátima, que sempre me  
transmitiram e transmitem  
serenidade frente a diversas  
contradições.*

*Agradecimientos*

---

*Agradeço a Deus por mais uma etapa concluída, pela graça concedida durante esses anos e por permitir que eu nunca abandonasse minha fé e minhas convicções, apesar de tantos desafios e tropeços, fazendo-me forte e confiante.*

*Aos meus pais, Fátima e Toshimasa Tanikawa, que auxiliaram e auxiliam na minha formação, tanto profissional como pessoal. A eles sou grata por quem me tornei, por tudo que conquistei e pelo que ainda serei e farei.*

*Aos meus irmãos, Addison e Arianna, e minha cunhada Lucimara. Pela preocupação real e companheirismo. Por torcerem verdadeiramente pelo meu sucesso!*

*À minha orientadora, Dra. Maria Inês de M. C. Pardini e coorientadora, Dra. Rejane M. T. Grotto. Agradeço pelas oportunidades concedidas durante o tempo em que permaneci no Laboratório de Biologia Molecular, pelos ensinamentos, auxílio em diversos assuntos, conselhos e pela confiança. Também à Dra. Adriana Ferrasi, por diversas vezes me auxiliar no Laboratório, por permitir com que eu “me inserisse” na sua linha de pesquisa, ouvindo discussões e aprendendo sobre assuntos diferentes.*

*Ao Dr. Giovanni F. Silva, por permitir a coleta de amostra, por auxiliar em qualquer dúvida clínica, científica e pelas oportunidades que me concedeu. Agradeço também a sua equipe de enfermagem por toda a ajuda prestada.*

*Agradeço a todos os pacientes que participaram da pesquisa e que foram tão solícitos!*

*À Valéria C. R. Sarnighausen pela realização das análises estatísticas.*

*A todos do Laboratório de Biologia Molecular que cooperaram com o meu desenvolvimento científico, com o projeto e/ou com a própria logística do laboratório (lembrando também dos que seguiram outras oportunidades, mas que enquanto presentes no laboratório foram participativos nas atividades que envolviam o projeto).*

*A todos também do Laboratório de Rotinas Diagnósticas. Sempre solícitos, permitindo a coleta de dados e auxiliando no que fosse necessário. Obrigada pela ajuda e pela amizade!*

*À Faculdade de Medicina de Botucatu, pelas oportunidades de conhecimento oferecidas e ao Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia em Clínica Médica.*

*A Capes (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), pelo auxílio financeiro na categoria bolsa de doutorado.*

*A todos os docentes com os quais pude ter contato e aprender sobre diversos assuntos.*

*À secretária do Programa, Ana Mengue. Obrigada pelas palavras positivas e pelos conselhos! Obrigada também pelo auxílio referente a assuntos da pós-graduação e por acreditar no meu crescimento profissional.*

*A todos da seção de Pós-Graduação. Sempre prontos a ajudar!*

*A todos os funcionários do Hemocentro do Hospital das Clínicas de Botucatu.*

*Ao Dr. Paulo Machado pela oportunidade de realizar trabalhos científicos em conjunto e por permitir a minha participação em reuniões científicas.*

*Às amigas: Aline Galvani, Bruna Ramos, Elisabete Franco, Karen Tasca, Michele Sankako, Natália Picelli, Sarita Barreto, Tainara Felix e Patrícia Sanches. Pela amizade, companheirismo e torcida sincera!*

*Agradeço pelos diversos momentos compartilhados, jantares, passeios, risadas, viagens, ajudas no laboratório, hospedagem e pelos diversos auxílios nessa fase final do doutorado. Por me ouvirem, apoiarem e me aguentarem durante todos esses anos (mesmo as que estiveram distantes).*

*Agradeço às amigas e colegas que auxiliaram com a parte experimental/coleta de dados e, conseqüentemente, com a finalização deste trabalho. Meus sinceros agradecimentos!*

*A todos do Laboratório de Imunologia do Hospital das Clínicas da Unicamp e colegas da Divisão de Patologia pelo apoio e incentivo na fase final do meu doutorado.*

*À minha amiga Susane Moreira, que nunca duvidou da minha capacidade, da minha sinceridade e integridade!*

*A todas as pessoas que, mesmo não citando os nomes, tenho certeza que torcem pelo meu sucesso, felicidade e alegria. Agradeço muitíssimo a amizade e o carinho!*

*Epígrafe*

---

*“O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis.”*

*José de Alencar*



*Grande é a satisfação, neste breve espaço, de prefaciar esta Tese de Doutorado.*

*Biomédica de formação a Aline chega ao Laboratório de Biologia Molecular do Hemocentro de Botucatu, Hospital das Clínicas, Faculdade de Medicina ingressando no Programa de Aprimoramento Profissional em Inovação Tecnológica e Diagnóstico Laboratorial.*

*Já nos primeiros meses de aprimoramento demonstra grande dedicação e comprometimento com o serviço, seus colegas, pacientes e profissionais.*

*Em pouco tempo já apresenta maturidade e crescimento científico para cursar o Mestrado, o qual desenvolve com as mesmas habilidades teóricas e práticas demonstradas ainda na fase de aprimoranda.*

*Os anos vão passando e, a Aline ingressa no Programa de Doutorado, concretizando, nesta fase, independência prática e científica que se espera de um Doutor.*

*No Laboratório de Biologia Molecular, do Hemocentro de Botucatu sempre se cultivou a ideia da formação do Doutor capaz de atuar como pesquisador, dentro de uma linha de pesquisa. Assim, nessa fase a Aline foi capaz de liderar, assumir responsabilidades práticas e teóricas no dia-a-dia do laboratório, participar na orientação de alunos ingressantes e, assim, consolidar sua formação acadêmica.*

*Nesta linha de raciocínio se deu o Doutorado da Aline, atuando cientificamente na rotina de acompanhamento*

*laboratorial de pacientes infectados pelo Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) e Vírus da Hepatite C (VHC) e, na pesquisa aplicada, atividades que se completam, fornecendo o ambiente para a adequada formação de um Doutor.*

*Neste cenário, aqui apresenta-se, em caráter formal, parte do produto desenvolvido pela Aline em seus anos de Doutorado. Digo parte, pois muito do aprendizado e consolidação científica adquirida não podem ser mensurados com métricas universais, mas tenho a certeza que a Aline, hoje, deixa o Laboratório de Biologia Molecular do Hemocentro de Botucatu com uma ampla formação, sendo capaz de conduzir, independentemente, sua própria carreira acadêmica.*

*Assim, este volume se encontra dividido nos seguintes capítulos: (I) Introdução: aqui são descritos, brevemente, pré-requisitos básicos necessários à compreensão dos demais capítulos; (II) Artigo: Avaliação dos fatores de crescimento TGF- $\beta$ 1 e PDGF na progressão da fibrose hepática em pacientes cronicamente infectados pelo Vírus da Hepatite C; (III) Artigo: The absence of the human platelet antigen polymorphism effect on fibrosis progression in human immunodeficiency virus-1/hepatitis C virus coinfected patients; (IV) Artigo: Coexistence of HIV-1 variants with dipeptidic insertion in the reverse transcriptase gene; (V) Artigo: Análise comparativa dos algoritmos de interpretação para o teste de genotipagem do HIV-1.*

*Este formato, ainda pouco convencional de apresentação uma Tese, é capaz de demonstrar a interdisciplinaridade, o dinamismo e a competência necessários à formação de um Doutor.*

*Finalizo este relato com a certeza do dever cumprido e com plena consciência e tranquilidade que você, Aline, se encontra extremamente preparada para assumir uma carreira profissional de sucesso e muitas conquistas.*

*Rejane*

## LISTA DE FIGURAS

### Capítulo I

<b>Figura 1:</b> Genoma do VHC e processamento da poliproteína.....	21
<b>Figura 2:</b> Árvore filogenética .....	22
<b>Figura 3:</b> Representação esquematizada do ciclo de vida do VHC .....	26
<b>Figura 4:</b> Alterações na arquitetura hepática.....	33
<b>Figura 5:</b> Participação das células estreladas hepáticas no desenvolvimento e regressão da fibrose .....	35
<b>Figura 6:</b> Vias de ativação da célula estrelada hepática .....	37
<b>Figura 7:</b> Sinalização de TGF- $\beta$ 1 .....	40

### Capítulo IV

<b>Figure.</b> Part of the electropherogram of a genomic sequence of the HIV-1 reverse transcriptase region .....	113
---	-----

## LISTA DE TABELAS

### Capítulo II

<b>Tabela 1:</b> Características demográficas e clínicas dos pacientes infectados pelo VHC incluídos no estudo.....	80
<b>Tabela 2:</b> Avaliação da expressão de RNAm de TGF- $\beta$ 1, PDGF-A e PDGF-B e nas plaquetas dos grupos G1 e G2, tendo como controle o tecido hepático correspondente.....	81
<b>Tabela 3:</b> Análise de variância para a variável expressão do TGF- $\beta$ 1 na plaqueta.	82
<b>Tabela 4:</b> Análise de diferença entre as médias dos valores de expressão do TGF- $\beta$ 1 nas plaquetas.....	82
<b>Tabela 5:</b> Análise de variância para a variável Expressão do PDGF-A no tecido....	82
<b>Tabela 6:</b> Análise de diferença entre as médias dos valores de expressão do PDGF-A no tecido.....	82
<b>Tabela 7:</b> Desvio, variância e proporção cumulativa das componentes principais..	83
<b>Tabela 8:</b> Coeficientes das 9 componentes principais .....	84
<b>Tabela 9:</b> Coeficientes de correlação simples entre as características avaliadas.....	85

### Capítulo III

<b>Table 1:</b> Demographic characteristics of HCV/HIV coinfecting patients included in the study (n=36) .....	109
<b>Table 2:</b> Allelic and genotypic frequency of HPA-1, -3 and -5 in HCV/HIV coinfecting patients in groups G1 (F1 and F2) and G2 (F3 and F4).....	109

## LISTA DE SIGLAS E SÍMBOLOS

µL	Microlitro
ALT/TGP	Alanina aminotransferase
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BOC	Boceprevir
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementar
CLDN-1	Claudina-1
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ECM	<i>Extracellular matrix</i> – matriz extracelular
FAK	<i>Focal adhesion kinase</i> - quinase de adesão focal
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
HPA	<i>Human platelet antigen</i> – antígeno plaquetário humano
HSC	<i>Hepatic stellate cells</i> – células estreladas hepáticas
IFN-α	Interferon alfa
IGF	<i>Insullin-like growth factor</i> – fator de crescimento semelhante à insulina
ILK	<i>Integrin-linked kinase</i> – quinase ligada à integrina
IMC	Índice de massa corporal
IRES	<i>Internal Ribosome Entry Site</i> – Sítio de entrada ribossomal
LAP	<i>Latent associated peptide</i> – peptídeo associado à latência
LPS	Lipopolissacarídeo
LTBP	<i>Latent TGF-β-Binding Protein</i> – proteína de ligação a TGF latente
mL	Mililitro
MMPs	<i>Matrix metalloproteinases</i> – metaloproteinases da matriz
NR	Não respondedor
OCLN	Ocludina
ORF	<i>Open Reading frame</i> – região aberta de leitura
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PDGF	<i>Platelet-derived factor</i> – fator de crescimento derivado de plaqueta

PDGFR $\alpha$ / PDGFR $\beta$	Receptores de PDGF
PI3 quinase	Fosfoinositol-3-quinase
qPCR	Reação de PCR em Tempo Real
RBV	Ribavirina
RE	Retículo endoplasmático
RGD	Sítio universal de reconhecimento
RNA	<i>Ribonucleic acid</i> – ácido ribonucleico
RTK	<i>Receptor tyrosine kinase</i> – receptor tirosina quinase
RVS	Resposta virológica sustentada
SR-BI/Cla1	Receptor scavenger tipo B classe I
TGF- $\beta$	<i>Transforming growth factor <math>\beta</math></i> – fator de crescimento beta
TGF- $\beta$ RI/ TGF- $\beta$ RII	Receptores de TGF- $\beta$
TIMPS	<i>Tissue inhibitors of the metalloproteinase</i> - inibidores teciduais das metaloproteinases
TVR	Telaprevir
UTR	<i>Untranslated Region</i> – região não traduzida
VEGFR-2	<i>Vascular endothelial growth factor receptor-2</i> – receptor 2 do fator de crescimento vascular endotelial
VHB	Vírus da Hepatite B
VHC	Vírus da Hepatite C
$\alpha$ -SMA	<i><math>\alpha</math>-smooth muscle actin</i> - actina $\alpha$ de músculo liso

## SUMÁRIO

<b>Capítulo I</b> .....	<b>19</b>
Introdução .....	20
<b>Capítulo II</b> .....	<b>69</b>
Artigo preparado para publicação: Avaliação dos fatores de crescimento TGF- $\beta$ 1 e PDGF na progressão da fibrose hepática em pacientes cronicamente infectados pelo Vírus da Hepatite C .....	70
<b>Capítulo III</b> .....	<b>95</b>
Artigo aceito para publicação: The absence of the human platelet antigen polymorphism effect on fibrosis progression in human immunodeficiency virus-1/hepatitis C virus coinfecting patients.....	96
<b>Capítulo IV</b> .....	<b>110</b>
Artigo publicado: Coexistence of HIV-1 variants with dipeptidic insertion in the reverse transcriptase gene .....	111
<b>Capítulo V</b> .....	<b>115</b>
Artigo em fase de elaboração: Análise comparativa dos algoritmos de interpretação para o teste de genotipagem do HIV-1 .....	116
<b>Anexo</b> .....	<b>118</b>
Anexo 1: Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP.....	119

# *Capítulo I*

---

## *Introdução*

O vírus da hepatite C (VHC) constitui a principal causa de doença hepática crônica infectando, aproximadamente, 185 milhões de pessoas no mundo (MOHD HANAFIAH et al., 2013).

No Brasil, entre 1999 e 2011, foram notificados 82.041 casos confirmados de hepatite C, sendo que destes, 67,3% correspondiam à região Sudeste, 22,3% à região Sul, 5% à região Nordeste e menos de 5% às regiões Centro-Oeste e Norte (BRASIL, 2012).

Apesar do progresso em compreender a imunidade contra a infecção pelo VHC e sua patogênese, além do desenvolvimento de antivirais efetivos de ação direta, a hepatite C continua sendo um dos maiores problemas de saúde pública devido à disseminação mundial do vírus, às diversas rotas de transmissão, à ausência de uma vacina profilática e, em longo prazo, ao desenvolvimento de fibrose avançada, cirrose e carcinoma hepatocelular (HAURI; ARMSTRONG; HUTIN, 2004; CZEPIEL; BIESIADA; MACH, 2008).

Enquanto a taxa de incidência da infecção pelo VHC está, aparentemente, diminuindo nos países desenvolvidos, mortes relacionadas à doença hepática secundária à infecção pelo VHC continuarão a aumentar nos próximos 20 anos (RAZAVI et al., 2013).

O VHC, descrito nos Estados Unidos em 1989 por Choo e colaboradores, apresenta um diâmetro de, aproximadamente, 50-60nm, pertence à família Flaviviridae, gênero *Hepacivirus*, com genoma constituído por uma fita simples de RNA de polaridade positiva, encapsulado por um envelope lipoproteico. O RNA viral apresenta 9,6 kb, com uma única região aberta de leitura (*Open Reading Frame*, ORF) que codifica proteínas estruturais e não estruturais, sendo flanqueada por duas regiões não traduzidas, 5'UTR (do inglês *Untranslated Region*) e 3'UTR

(LINDENBACH; RICE, 2005). A região 5'UTR é altamente conservada, pois possui um sítio de entrada ribossomal (*Internal Ribosome Entry Site*, IRES) que está envolvido no processo de síntese proteica viral. Durante a expressão do genoma viral é sintetizada uma única poliproteína de, aproximadamente, 3000 aminoácidos, que é posteriormente clivada pelas enzimas virais e celulares constituindo as proteínas estruturais (core, E1, E2) e as não estruturais (p7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A, NS5B) (ROSEN; GRETCH, 1999; MORADPOUR; PENIN; RICE, 2007) (Figura 1).

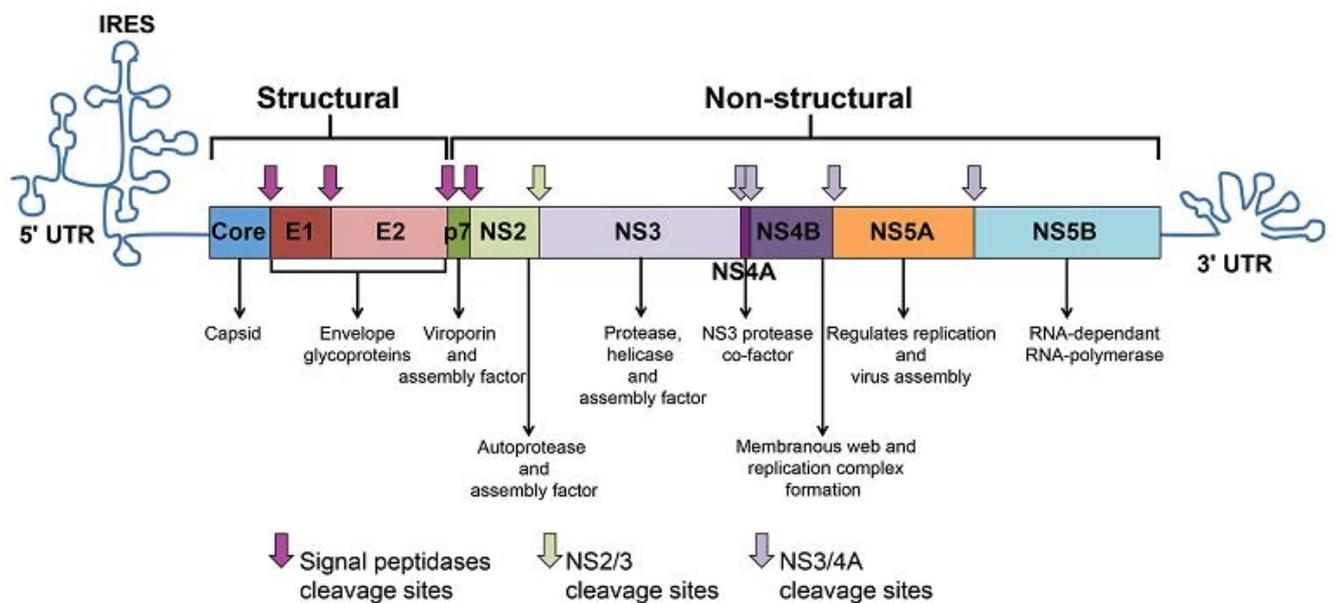


Figura 1: Representação esquemática do RNA do VHC com uma única região de leitura aberta (ORF) flanqueada pelas regiões 5'UTR e 3'UTR. A tradução mediada pelo IRES da ORF origina uma poliproteína que é, posteriormente, processada em dez proteínas virais. A clivagem da proteína core envolve peptidases sinais celulares, as quais também clivam E1, E2, p7 (setas rosa). A protease NS2-NS3 sofre auto-clivagem (seta verde). A protease NS3 auxiliada pelo cofator NS4A cliva as proteínas restantes (setas violeta) (Fonte: de ABDEL-HAKEEM; SHOUKRY, 2014).

O genoma altamente heterogêneo quanto à sequência de nucleotídeos (devido à alta atividade replicativa do vírus e ausência de atividade de reparo das enzimas virais), distingue sete genótipos, nomeados de 1 a 7 e mais de 60 subtipos, os quais são designados por letras do alfabeto, além das *quasispecies* (SMITH et al., 2014). As sequências de nucleotídeos entre os diferentes genótipos diferem em, aproximadamente, 30-35%, e entre os subtipos de 20-25% (SIMMONDS, 2005) (Figura 2).

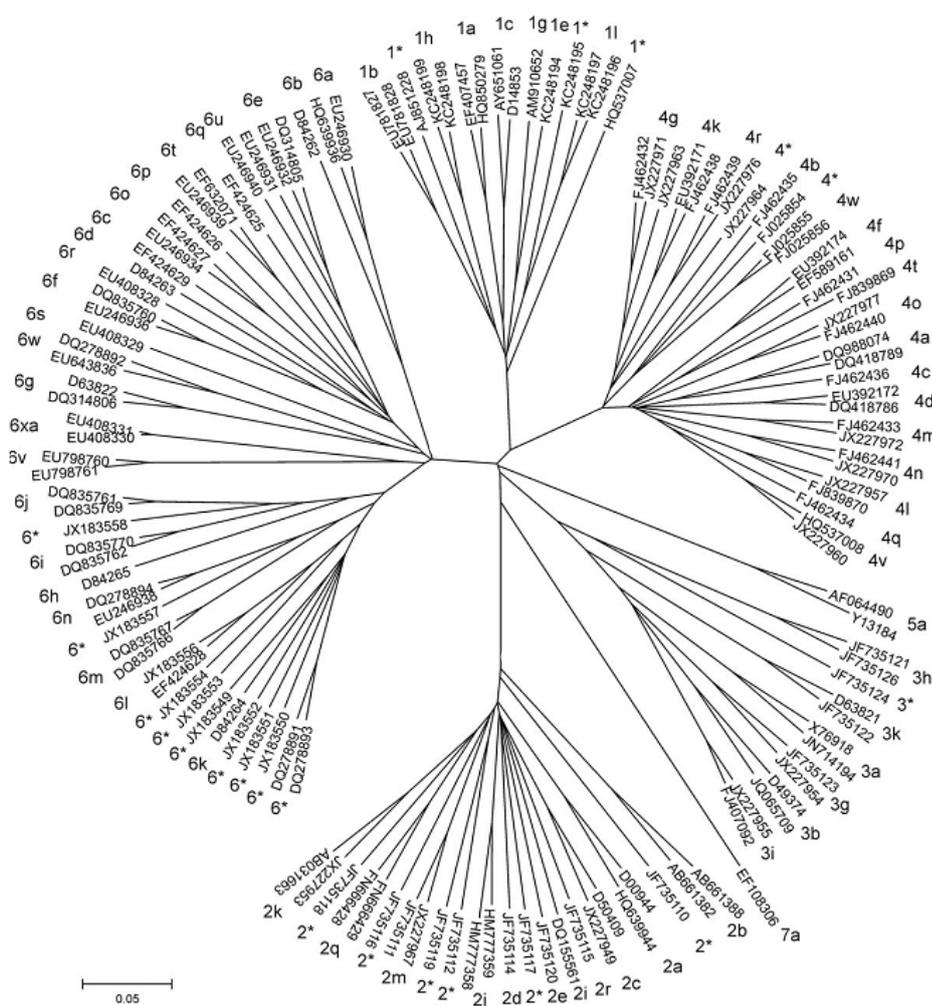


Figura 2: Árvore filogenética contendo genótipos (representados por algarismos arábicos) e subtipos (representados por letras do alfabeto) do VHC (\* subtipo não atribuído; para os genótipos 1, 2, 3, 4 e 6) (Fonte: adaptado de SMITH et al., 2014).

A distribuição dos genótipos é dependente da região geográfica e, mundialmente, o genótipo 1 é o mais prevalente (46,2%), seguido pelo 3 (30,1%). Os genótipos 2, 4 e 6 são responsáveis pela maior parte dos demais casos no mundo, com estimativas de 9,1%, 8,3% e 5,4%, respectivamente. O leste europeu possui o maior número de casos de genótipo 2 e 6, enquanto o Norte da África e Oriente Médio apresentam os maiores números de casos de genótipo 4. O genótipo 5 é responsável por menos de 1% dos casos de infecção pelo VHC, ocorrendo principalmente na África do Sul e Subsaariana (MESSINA et al., 2015). Em relação ao VHC genótipo 7, este foi isolado no Canadá proveniente de um paciente imigrante da África Central (MURPHY et al., 2007) e, atualmente, foram identificados outros pacientes infectados por esse genótipo (MURPHY et al., 2015). No Brasil, o genótipo 1 é o mais prevalente, seguido pelos genótipos 3 e 2 (AMORIN et al., 2004, CAMPIOTTO et al. 2005; MARTINS et al. 2006).

O VHC é um vírus hepatotrópico que infecta hepatócitos. No entanto, o vírus já foi encontrado em linfócitos T e B (PAVIO; LAI, 2003), monócitos, macrófagos (MULLER et al., 1993), células dendríticas (NAVAS et al., 2002) e plaquetas (HERNANDEZ et al., 1998), estando estas relacionadas com o carreamento do vírus pela corrente circulatória em indivíduos infectados (HAMAIA; LI; ALLAIN, 2001).

A infecção pelo VHC é altamente dinâmica, com uma meia vida viral de poucas horas e produção/liberação estimada de  $10^{12}$  vírions por dia em um indivíduo infectado. No entanto, a entrada do vírus nos hepatócitos constitui uma fase essencial para a infecção, processo que se encontra na dependência de interações entre componentes virais, principalmente proteínas do envelope, e fatores de superfície celular do hospedeiro (BURLONE; BUDKOWSKA, 2009). Várias moléculas expressas na superfície celular dos hepatócitos já foram associadas à

entrada do VHC em sua célula alvo como a tetraspanina CD81 (PILERI et al., 1998), principal receptor envolvido neste processo; o receptor *scavenger* tipo B classe I (SR-BI/Cl<sub>a</sub>1) (SCARSELLI et al., 2002); claudina-1 (CLDN-1) (EVANS et al., 2007) e ocludinas (OCLN) (LIU et al., 2009). Além dessas, algumas glicosaminoglicanas também vêm sendo associadas à adesão e entrada do VHC nas células (AGNELLO et al., 1999; CORMIER et al., 2004). Outros estudos sugerem a participação de proteínas de adesão celular na entrada do VHC. No entanto, o mecanismo exato de entrada do vírus nas células permanece ainda desconhecido (BURLONE; BUDKOWSKA, 2009).

As glicoproteínas do envelope são os principais determinantes para a entrada do VHC. Elas apresentam função na ligação ao receptor e medeiam o processo de fusão entre o envelope viral e a membrana endossomal da célula hospedeira (VIEYRES et al., 2010).

Após a ligação à superfície celular, os passos posteriores são parcialmente compreendidos e envolvem uma série de fatores celulares de entrada. Verifica-se que a ação coordenada de, pelo menos, quatro principais fatores é essencial para a entrada do VHC. Entre estes estão o SR-BI, a tetraspanina CD81 e proteínas de junção de oclusão, CLDN1 e OCLN. A tetraspanina CD81 é indiscutivelmente a principal proteína no ciclo de vida do VHC (FENEANT; LEVY; COCQUEREL, 2014) e resíduos de aminoácidos envolvidos na ligação a este receptor estão localizados na superfície da proteína E2 (KONG et al., 2013). Esta interação parece privilegiar as proteínas do envelope do vírus para uma fusão de baixa dependência de pH (SHARMA et al., 2011).

A endocitose da partícula viral é um processo dependente de clatrina e, após a fusão do envelope viral com a membrana da vesícula endocítica, o genoma do vírus

é liberado para o citosol (HELLE; DUBUISSON, 2008). A tradução do RNA viral é iniciada com o auxílio de fatores celulares. A região 5'UTR possui um sítio de entrada ribossomal, a partir do qual é iniciada a tradução do genoma do VHC em uma única poliproteína. Proteases virais e do hospedeiro processam a poliproteína em dez proteínas maduras: core, E1, E2, p7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A e NS5B (MORADPOUR; PENIN; RICE, 2007).

Após a tradução, as proteínas virais são associadas com membranas derivadas do retículo endoplasmático (RE). Juntas, NS3/4A, NS4B, NS5A e NS5B constituem as proteínas virais da maquinaria de replicação, a qual replica a fita positiva de RNA a partir de uma intermediária negativa. A proteína NS5B RNA polimerase dependente de RNA é a principal enzima para a síntese de RNA. O RNA viral é, então, internalizado em vesículas do RE, o que leva à formação de nucleocapsídeo. Este é envelopado e maturado no aparelho de Golgi, e liberado por exocitose (MORADPOUR et al., 2004; MORADPOUR; PENIN; RICE, 2007). Na Figura 3 é possível visualizar de forma simplificada o ciclo de vida do VHC, desde sua entrada até a liberação da partícula infectante.

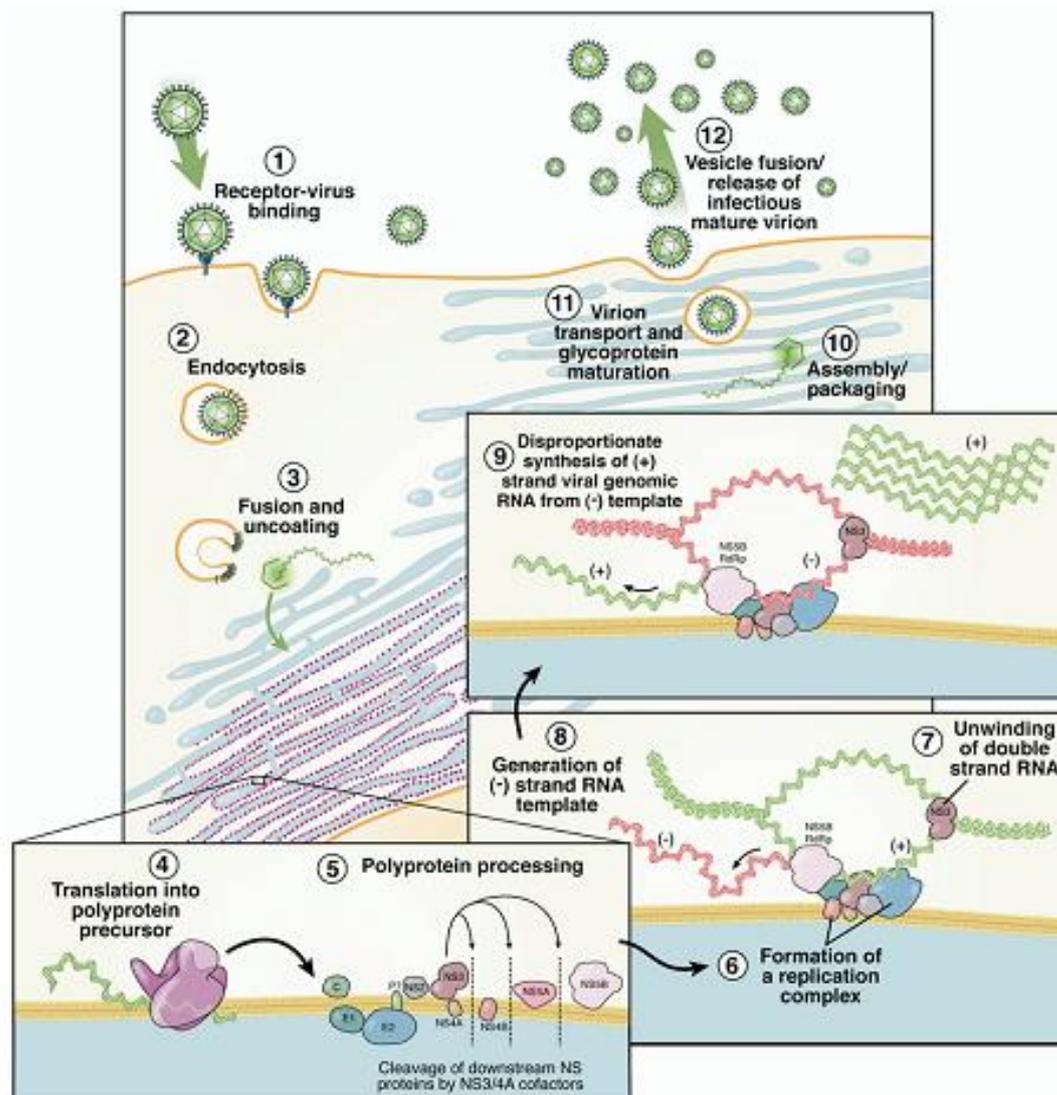


Figura 3: Representação esquemática do ciclo de vida do VHC. (1) Ligação receptor-vírus; (2) endocitose; (3) fusão e liberação do capsídeo; (4) tradução em proteína precursora mediada pelo IRES; (5) processamento da poliproteína; (6) formação do complexo de replicação; (7, 8, 9) replicação do RNA viral; (10) montagem/empacotamento; (11) transporte do vírion e maturação da glicoproteína; (12) fusão da vesícula e liberação do vírion infeccioso maduro (Fonte: PAWLOTSKY; CHEVALIEZ; MCHUTCHISON, 2007).

A infecção apresenta diferentes formas de evolução. O clearance viral espontâneo após a infecção, ou seja, sorologia reagente para anticorpos anti-VHC, porém RNA viral indetectável no plasma do paciente ocorre em, aproximadamente, 20 a 25% dos casos, e é mais frequente em mulheres e indivíduos jovens (ALTER,

1997). A fase aguda da doença dura seis meses e caracteriza-se pela elevação, principalmente, de alanina transaminase (ALT/TGP) (BRASIL, 2011). Comumente, a hepatite C é diagnosticada na fase crônica, o que se deve à falta de sintomas específicos. Muitas vezes, o diagnóstico específico ocorre após teste sorológico de rotina ou mesmo na doação de sangue (THOMAS et al., 2000; ROTH et al., 2002). A fase crônica caracteriza-se por cirrose hepática em cerca de 20% dos casos e 1 a 5% dos pacientes desenvolve hepatocarcinoma (CHARLTON, 2001).

A progressão da doença encontra-se na dependência de fatores virais e do hospedeiro. Vem sendo demonstrado que a progressão rápida da hepatite está relacionada com diversos fatores, como: genótipo viral, em particular o genótipo 1b que tem sido associado à maior severidade da doença hepática do que outros genótipos (BRUNO et al., 1997; TANAKA et al., 1998), consumo de álcool, duração da infecção viral, coinfeção com HIV (*Human Immunodeficiency Virus*), coinfeção com Vírus da Hepatite B (VHB), nível de ALT/TGP, diabetes *mellitus*, obesidade e raça (POYNARD, et al., 2000; FREEMAN et al., 2001; SEEFF, 2002; WAWRZYNOWICZ-SYCZEWSKA et al., 2004). Assim, o tratamento antiviral tem como objetivo controlar a progressão da doença hepática por meio da inibição da replicação viral.

O sucesso do tratamento é definido pela obtenção de uma resposta virológica sustentada (RVS), ou seja, níveis de RNA do VHC indetectáveis (inferior a 12 UI/mL) por análise quantitativa após 24 semanas do término do tratamento (ZEUZEM et al., 2004). O primeiro medicamento disponível para o tratamento da hepatite C crônica foi o Interferon alfa recombinante (IFN- $\alpha$ ), o qual demonstrou eficácia limitada. Após sua associação com a Ribavirina (RBV), a eficácia do esquema foi aprimorada (FRIED et al., 2002). Posteriormente, com o desenvolvimento de formas modificadas

de interferon e a utilização do Interferon Peguilado associado com a RBV, houve uma melhora relevante na porcentagem de RVS (ZEUZEM et al., 2004). Mais recentemente, foram desenvolvidos antivirais de ação direta na atividade replicativa do vírus, os chamados inibidores de protease, como o Boceprevir (BOC) e o Telaprevir (TVR), que são utilizados para o tratamento de pacientes infectados pelo vírus genótipo 1 que não responderam ao esquema terapêutico convencional (BRASIL, 2013). Em 2015, mais três medicamentos (Daclatasvir, inibidor da proteína NS5A; Simeprevir, inibidor da protease NS3/4A; Sofosbuvir, inibidor da polimerase NS5B) foram aprovados pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) com o objetivo de tornar o tratamento mais eficiente e moderno, não havendo a necessidade do uso de interferon (BRASIL, 2015).

Alguns fatores podem influenciar na resposta ao tratamento, como características imunológicas do hospedeiro e genótipo viral. Sabe-se que pacientes infectados por vírus genótipos 1 ou 4 apresentam menores índices de RVS (cerca de 50%) quando comparados a portadores de VHC de outros genótipos (MANNING et al., 2006). Em relação ao hospedeiro, a presença de polimorfismos em genes estimuladores de interferon pode apresentar importante papel na resposta ao tratamento, inclusive no clareamento viral (WELZEL et al., 2009; GE et al., 2009).

Além da resposta virológica sustentada, há outros dois principais desfechos possíveis para os pacientes em tratamento: recidiva virológica, definida como RNA viral indetectável ao final do tratamento, mas detectável 24 semanas após o término do tratamento; e não resposta, caracterizando os pacientes nulos de resposta ou não respondedores (NR), que não apresentam queda de pelo menos 2 log do valor do RNA viral pré-tratamento na 12 semana de tratamento (BRASIL, 2011).

A infecção crônica pelo VHC conduz à fibrose hepática, que consiste no acúmulo de matriz extracelular, ou cicatriz, em resposta à injúria provocada pelo vírus no tecido hepático. Durante o curso da hepatite C a fibrose pode ser progressiva e seu estadiamento final é um quadro de cirrose, que resulta na formação de nódulos que podem conduzir à alteração da função hepática e fluxo sanguíneo (ROCKEY; FRIEDMAN, 2006).

A biópsia hepática é considerada padrão-ouro na avaliação do dano hepático. É possível classificar a atividade necroinflamatória e o estadiamento da fibrose a partir da análise histopatológica. A histopatologia da hepatite C crônica apresenta as alterações clássicas das hepatites crônicas e também aspectos peculiares, como agregados linfoides proeminentes em espaços-porta, lesão de ductos biliares e esteatose leve à moderada (POYNARD et al., 2000; POYNARD et al., 2003). Para o estadiamento da fibrose hepática uma das classificações utilizadas é o escore do sistema METAVIR, onde F0 significa ausência de fibrose, F1 fibrose portal sem septos, F2 expansão fibrosa com poucos septos, F3 numerosos septos podendo visualizar esboços de nódulos e, F4 cirrose (POYNARD; BEDOSSA; OPOLON, 1997).

No entanto, a técnica possui limitações por ser uma metodologia invasiva (SEEF et al., 2010), apresentar variações de amostragem (RATZIU et al., 2005) e por existir variabilidade intra e interobservador (REGEV et al., 2002; PERSICO et al., 2002). Assim, diversas avaliações não-invasivas, incluindo técnicas de imagem e testes sorológicos, têm sido desenvolvidas para análise da fibrose hepática (GUHA; ROSENBERG, 2008). A elastografia hepática transitória (FibroScan<sup>®</sup>, Echosens, França) avalia a elasticidade tissular e estima o grau de fibrose de forma não-invasiva (SANDRIN et al., 2003). Além disso, possui elevada concordância intra e

interobservador e é um exame reprodutível. No entanto, essa reprodutibilidade pode ser reduzida na presença de IMC (índice de massa corporal)  $\geq 25\text{kg/m}^2$ , esteatose  $\geq 25\%$  dos hepatócitos, estágio de fibrose hepática  $< 2$  (METAVIR) e em indivíduos com espaços intercostais estreitos (FRAQUELLI et al., 2007). Não é possível obter resultados da elastografia transitória em pacientes com ascite (SANDRIN et al., 2003).

Tanto a fibrose como a cirrose são consequências de uma resposta sustentada de cicatrização à injúria hepática crônica (ROCKEY; FRIEDMAN, 2006) e, no caso da infecção pelo VHC, fatores do hospedeiro mais do que fatores virais parecem estar correlacionados com a progressão da fibrose, pois parece não existir relação entre carga viral ou genótipo e severidade da fibrose, apesar de tais fatores afetarem a resposta à terapia antiviral. Além disso, polimorfismos genéticos estão sendo relacionados com a progressão da fibrose e o fenótipo imunológico do hospedeiro pode ser importante fator para esta progressão. Outros fatores como sexo, idade à infecção, consumo de álcool e coinfeção com outros vírus já foram relacionados com a progressão da fibrose (EYESTER et al., 1993; POYNARD; BEDOSSA; OPOLON, 1997; THOMAS et al., 2000).

A fibrogênese hepática pode ser definida como um processo molecular, tecidual e celular dinâmico e altamente integrado, que durante o curso da doença crônica hepática leva a um acúmulo excessivo e progressivo dos componentes da matriz extracelular na tentativa de limitar as consequências da injúria crônica do parênquima (FRIEDMAN, 2008a; PAROLA; MARRA; PINZANI, 2008; DRANOFF; WELLS, 2010). Independente da etiologia, acredita-se que a fibrogênese hepática é crucial para a progressão de qualquer forma de doença hepática crônica e a fibrogênese persistente é amplamente reconhecida como a principal “força motriz”

que leva à cirrose e insuficiência hepáticas (FRIEDMAN, 2008a; PAROLA; MARRA; PINZANI, 2008; DRANOFF; WELLS, 2010; FORBES; PAROLA, 2011; ZHANG; FRIEDMAN, 2012).

A cirrose é atualmente definida como um estado avançado da doença crônica hepática, caracterizada pela formação de nódulos regenerativos do parênquima, envoltos e separados por septos fibróticos e associados com mudanças significativas na arquitetura vascular do órgão, levando ao desenvolvimento de hipertensão portal e complicações relacionadas, como sangramento de varizes esofágicas, encefalopatia hepática, ascite e síndrome hepatorenal (FRIEDMAN, 2008a; PAROLA; MARRA; PINZANI, 2008; DRANOFF; WELLS, 2010; FORBES; PAROLA, 2011; ZHANG; FRIEDMAN, 2012; ROSSELLI et al., 2013).

Danos aos tecidos podem ser resultantes de diversos estímulos, como infecções, reações autoimunes, toxinas, radiação e injúria mecânica. O processo de reparo normalmente envolve duas fases distintas: uma fase regenerativa, na qual as células danificadas são substituídas por células do mesmo tipo, com ausência de qualquer evidência de dano duradouro; e uma fase conhecida como fibroplasia ou fibrose, na qual tecidos conectivos substituem o parênquima normal (WYNN, 2008).

Quando células epiteliais e/ou endoteliais sofrem injúria, elas liberam mediadores inflamatórios que iniciam uma cascata de coagulação antifibrinolítica (KUMAR; ABBAS; FAUSTO, 2005), a qual leva à formação de coágulo sanguíneo e de matriz extracelular provisória. Plaquetas expostas aos componentes da matriz promovem agregação, formação de coágulo e hemóstase. Células inflamatórias são recrutadas ao sítio de injúria e fatores de crescimento, citocinas e quimiocinas são produzidas, as quais estimulam a proliferação e recrutamento de leucócitos através da matriz extracelular provisória. Algumas das primeiras células responsivas são

macrófagos e neutrófilos, que eliminam *debris* celulares, células mortas e organismos invasores, e produzem citocinas e quimiocinas, as quais são mitogênicas e quimiotáticas para células endoteliais. Há também ativação de linfócitos e secreção de citocinas e fatores de crescimento pró-fibróticos, como o fator de crescimento transformante-beta1, do inglês *Transforming Growth Factor  $\beta$ 1* (TGF- $\beta$ 1), e o fator de crescimento derivado de plaqueta, do inglês *Platelet-Derived Growth Factor* (PDGF) (WYNN, 2003; LI et al., 2006; PARSONS; TAKASHIMA; RIPPE, 2007), que estimulam a ativação de macrófagos e fibroblastos. Estes últimos ativados passam a apresentar fenótipo de miofibroblasto, o qual promove a contração da ferida. Por fim, células epiteliais e/ou endoteliais dividem-se e migram ao longo das camadas basais para regenerar o tecido danificado, completando o processo de cicatrização da ferida. No entanto, a inflamação e o reparo crônicos podem dar início a um acúmulo excessivo dos componentes da matriz extracelular, levando à formação permanente de cicatriz fibrótica (PARDO; SELMAN, 2006).

Desta forma, a fibrose é resultado do desbalanço entre a produção e a resolução da matriz extracelular. A deposição excessiva de matriz extracelular (especialmente a deposição de colágeno tipo 1) desarranja a arquitetura normal do fígado, resultando na progressão da fibrose e subsequente cirrose (WYNN; RAMALINGAM, 2012). Há também o acúmulo de outras proteínas da matriz, incluindo elastina, hialurona, proteoglicanas e fibronectina. Este tipo de matriz possui a capacidade de ativar células estreladas do fígado quiescentes (HSC, do inglês *hepatic stellate cells*), levando à perda de microvilosidade dos hepatócitos e ao desaparecimento de endotélios fenestrados (MCGUIRE et al., 1992; SCHUPPAN et al., 2001; HERNANDEZ-GEA; FRIEDMAN, 2011). Tal alteração das células

endoteliais prejudica o transporte de solutos do sinusoide aos hepatócitos, favorecendo a disfunção destes (MCGUIRE et al., 1992) (Figura 4).

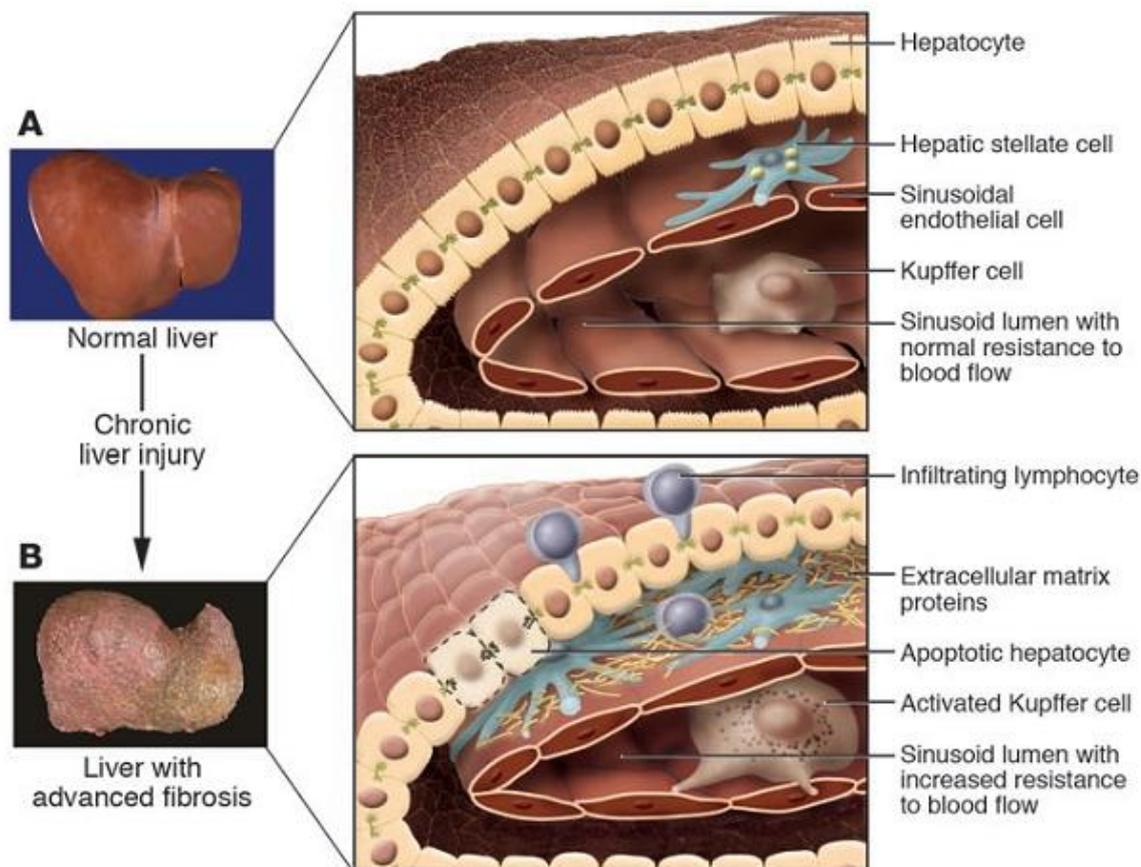


Figura 4: Alterações na arquitetura hepática (A) associadas com a fibrose hepática avançada (B). Após a lesão crônica hepática, linfócitos inflamatórios infiltram no parênquima hepático. Alguns hepatócitos sofrem apoptose e células de Kupffer ativadas secretam mediadores fibrogênicos. HSCs proliferam e passam por ativação fenotípica, secretando grandes quantidades de proteínas da matriz extracelular. Células sinusoidais perdem suas fenestrações e a contração tônica das HSCs causa aumento da resistência ao fluxo sanguíneo nos sinusoides hepáticos (Fonte: BATALLER; BRENNER, 2005).

As principais células responsáveis pela fibrogênese, os miofibroblastos, são células altamente proliferativas que migram e acumulam em sítios de injúria hepática em resposta a um estímulo autócrino e parácrino de diversos fatores de crescimento, citocinas, mediadores lipídicos ou adipocinas, além de radicais livres (estresse oxidativo), produzidos pelo fígado lesionado (MALLAT; LOTERSZTAJN, 2013). O *pool* de miofibroblasto é heterogêneo, consistindo de células estreladas, fibroblasto portal e fibroblasto derivado da medula óssea (WYNN; RAMALINGAM, 2012). No entanto, as HSCs representam o principal colaborador para a fibrogênese (MEDERACKE et al., 2013).

Sinais pró-fibrogênicos decorrentes da reação inflamatória originária da injúria do parênquima hepático levam à ativação das HSCs (BACHEM et al., 1992). O fenótipo miofibroblástico destas é caracterizado pela expressão de actina  $\alpha$  de músculo liso ou  $\alpha$ -SMA (do inglês  *$\alpha$ -smooth muscle actin*); uma perda paralela de retinoides e gotículas lipídicas; uma redução na expressão de fatores adipogênicos/lipogênicos; e uma expressão *de novo* de receptores de fatores fibrogênicos, quimiotáticos e mitogênicos (MALLAT; LOTERSZTAJN, 2013). Lipopolissacarídeo (LPS) originário da microflora intestinal também pode ativar HSCs a partir da via de sinalização de receptor tipo toll 4, a qual aumenta a expressão de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias (SEKI et al., 2007; DE MINICIS et al., 2007).

Modelos experimentais de reparação da fibrose relataram consistentemente que a eliminação de HSCs ativadas por apoptose (IREDALE et al., 1998) ou senescência (KRIZHANOVSKY et al., 2008) precede a restauração de vias fibrolíticas e regressão da fibrose, sugerindo, então, que o *clearance* de HSCs ativadas é um passo importante para o início da regressão. Trabalhos recentes de

Kisseleva e colaboradores (2012) e Troeger e colaboradores (2012) verificaram, utilizando modelos animais, a reversão do estado ativado de HSCs durante a reparação da fibrose. Embora as HSCs readquiram marcadores de quiescência durante a resolução da fibrose, foi constatado que tais células não são idênticas às células que nunca foram ativadas, apresentando um fenótipo intermediário com capacidade elevada de reativar quando tratadas com TGF- $\beta$ 1, um sinal clássico fibrogênico (FRIEDMAN, 2012; MALLAT; LOTERSZTAJN, 2013) (Figura 5).

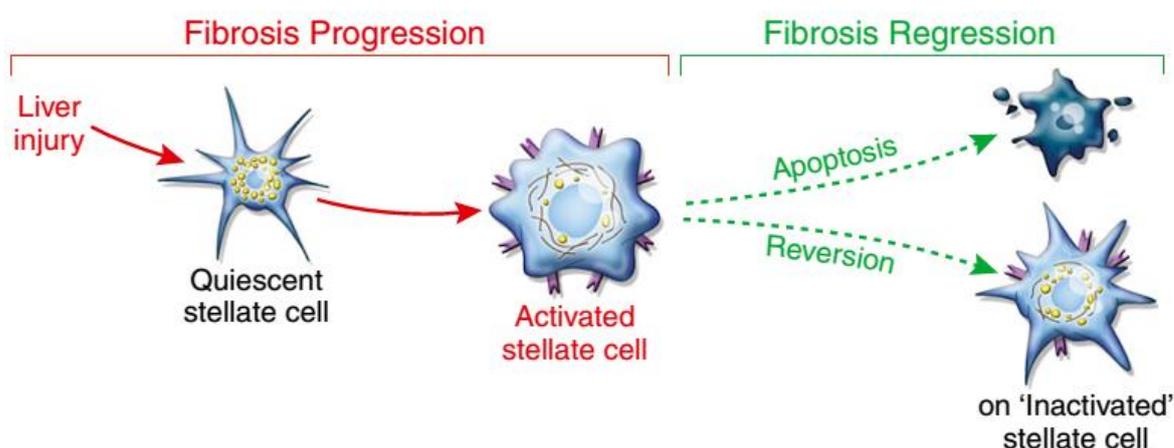


Figura 5: Esquema ilustrativo da participação das células estreladas hepáticas no desenvolvimento e regressão da fibrose. Após a injúria ao fígado, a ativação de células estreladas leva à progressão da fibrose. A ativação reflete a transdiferenciação de uma célula quiescente rica em vitamina A para uma célula estrelada ativada/miofibroblasto, a qual expressa receptores mitogênicos e é contrátil com uma redução no conteúdo de vitamina A. Se a injúria é atenuada, a regressão da fibrose pode ocorrer, levando tanto à apoptose das células estreladas como à reversão para um estado inativo com características restauradas de quiescente. No entanto, células estreladas inativas ainda mantêm um fenótipo intermediário, com capacidade aumentada de responder a sinais fibrogênicos e reativar com novo dano (Fonte: Friedman, 2012).

A ativação das HSCs consiste em uma resposta programada, que pode ser grosseiramente dividida em duas fases: iniciação e perpetuação (FRIEDMAN, 2000). A iniciação está associada com a rápida indução gênica resultante de estimulação parácrina por células inflamatórias, plaquetas e hepatócitos lesionados. A perpetuação é um processo dinâmico contínuo, o qual engloba eventos celulares que amplificam o fenótipo ativado a partir do aumento da expressão de fatores de crescimento e da capacidade de resposta; esta fase de ativação resulta de estimulação autócrina e parácrina, assim como do remodelamento acelerado da matriz extracelular (FRIEDMAN, 2008b; LI et al., 2008) (Figura 6).

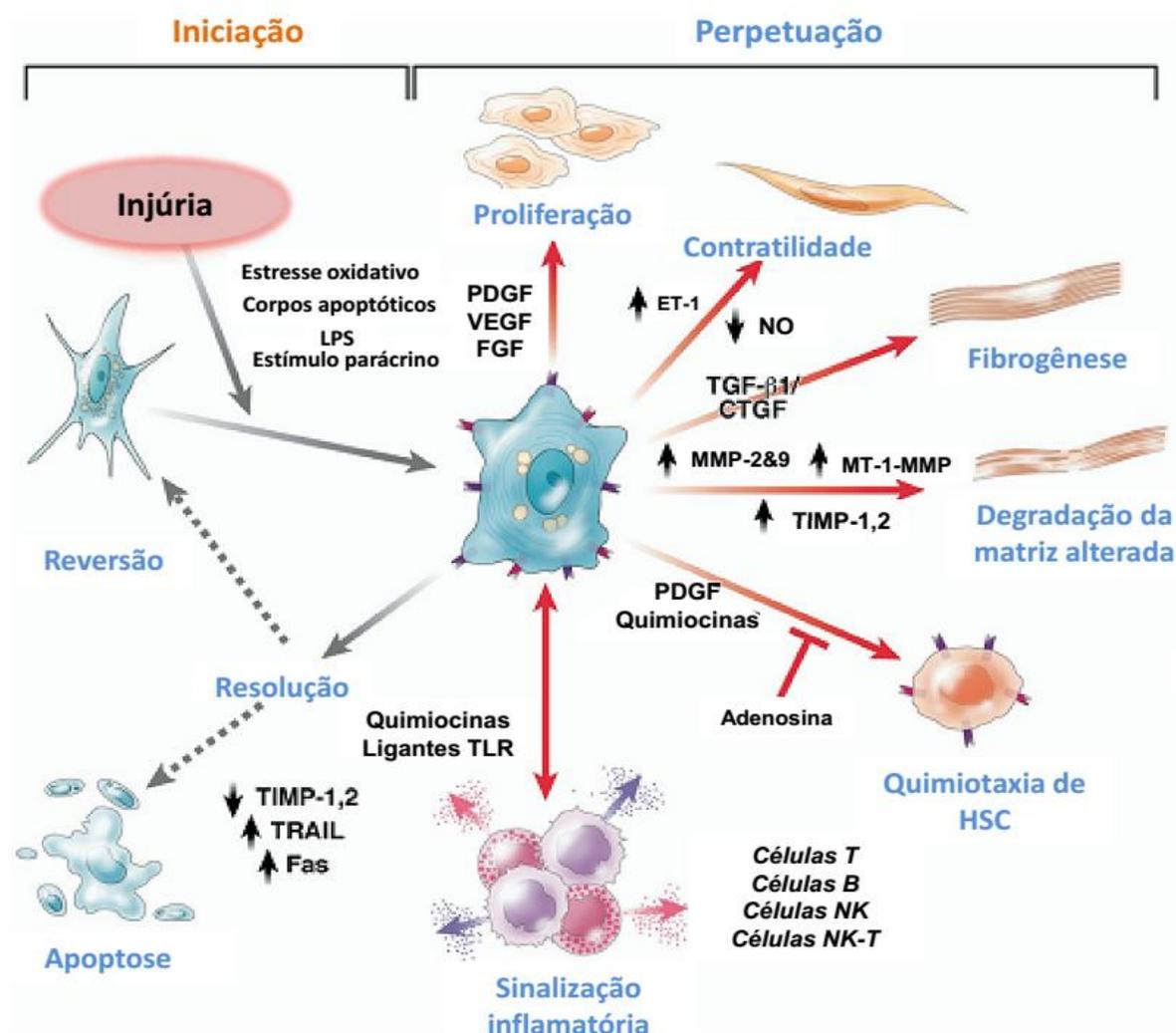


Figura 6: Vias de ativação da célula estrelada hepática. Características da ativação podem ser distinguidas entre aqueles que estimulam a inicialização e aqueles que contribuem para a perpetuação. A inicialização é provocada por estímulos solúveis que incluem sinais de estresse oxidativo (intermediários reativos de oxigênio), corpos apoptóticos, lipopolissacarídeo (LPS) e estímulo parácrino de tipos celulares vizinhos, incluindo macrófagos hepáticos (células de Kupffer), endotélio sinusoidal e hepatócitos. A perpetuação segue caracterizada por diversas alterações fenotípicas, incluindo proliferação, contratilidade, fibrogênese, alteração da degradação da matriz, quimiotaxia e sinalização inflamatória. CTGF, fator de crescimento de tecido conjuntivo; FGF, fator de crescimento de fibroblasto; ET-1, endotelina-1; MMP, metaloproteinases; NO, óxido nítrico; TIMP, inibidor tecidual de metaloproteinase; TRAIL, ligante indutor de apoptose relacionado ao fator de necrose tumoral; VEGF, fator de crescimento endotelial vascular (Fonte: traduzido de FRIEDMAN, 2008a).

As HSCs e os miofibroblastos portais possuem a capacidade de amplificar o sinal inflamatório no fígado lesionado pela promoção do recrutamento de células inflamatórias. Eles produzem quimiocinas que regulam o recrutamento de células mononucleares e neutrófilos (MARRA et al., 1993; SEKI et al., 2009), e expressam receptores de quimiocinas com propriedades pró-fibrogênicas (WINAU et al., 2007).

O balanço entre metaloproteinases da matriz (MMPs, *matrix* metaloproteinases - enzimas que degradam a matriz) e inibidores teciduais das metaloproteinases (TIMPs, do inglês *tissue inhibitors of the metalloproteinases*) estão fortemente regulados pelas HSCs. Nos estágios iniciais da fibrogênese, HSCs expressam MMPs, mas não TIMPs, levando à degradação da matriz extracelular hepática. No entanto, HSCs integralmente ativadas expressam TIMPs e inibem MMPs, inibindo assim a degradação da matriz. Ademais, as moléculas da matriz extracelular, a rigidez da matriz, e a ligação cruzada do colágeno promovem o processo de ativação das HSCs através de vias mediadas por integrinas (IREDALE; THOMPSON; HENDERSON, 2013).

A expressão diferencial de integrinas já foi relacionada com a progressão da fibrose (NEJJARI et al., 2001; POPOV et al., 2008). Muitas das principais interações célula-célula e célula-matriz que regulam o processo de fibrose são mediadas por moléculas de adesão membros da família das integrinas (HENDERSON; SHEPPARD, 2013). Além de seus efeitos na proliferação e sobrevivência celulares, as integrinas podem também potencializar sinais provenientes de fatores de crescimento solúveis, como do TGF- $\beta$ 1, a partir da ativação da forma latente da proteína (MUNGER et al., 1999; MU et al., 2002; ASANO et al., 2005).

Sob condições fisiológicas, o TGF- $\beta$ 1 regula o remodelamento tecidual e apoptose para manter a homeostase celular (SCHUSTER; KRIEGLSTEIN, 2002;

GUO; CHEN, 2012). Sob condições patológicas, é um potente indutor de fibrose. O TGF- $\beta$  é a molécula mais extensivamente estudada na fibrose e há três isoformas (TGF- $\beta$ 1-3). Todas possuem atividade biológica similar, embora cada isoforma seja expressa em padrão distinto sob o controle de um único promotor (ATTISANO; WRANA, 1996; LETTERIO; ROBERTS, 1998). Não obstante uma ampla variedade de tipos celulares produza e responda ao TGF- $\beta$ , foi a isoforma TGF- $\beta$ 1 associada principalmente à fibrose tecidual (ASK et al, 2008).

O TGF- $\beta$ 1 é a citocina pró-fibrogênica mais potente, acelerando a fibrose hepática pelo desencadeamento da transformação das células estreladas e pela participação na cascata de sinalização intracelular e regulação transcricional gênica. Devido a sua importância, a regulação do TGF- $\beta$ 1 tem recebido atenção considerável. Apesar de existirem muitas fontes desta citocina, a expressão autócrina está entre as mais importantes (GRESSNER et al., 2002; PARSONS et al., 2007). Vários mecanismos constituem a base do aumento na expressão de TGF- $\beta$ 1 pelas células estreladas durante a injúria hepática, incluindo a regulação positiva transcricional do TGF- $\beta$ , ativação do TGF- $\beta$ 1 latente, aumento da expressão de receptores de TGF- $\beta$ , e a regulação positiva dos componentes de sinalização do TGF- $\beta$  (DOOLEY et al., 2000; WELLS, 2000; SCHNABL et al., 2001; LIU et al., 2004; WELLS; KRUGLOV; DRANOFF, 2004).

A interação do TGF- $\beta$  com seu receptor formado pelo complexo heterodimérico serina/treonina quinase, TGF- $\beta$ RI e TGF- $\beta$ RII, leva ao recrutamento e fosforilação de proteínas intracelulares efetoras Smad2 e Smad3. Estas fosforiladas ligam-se à Smad4 e translocam-se para o núcleo para dar início à expressão gênica de genes alvos do TGF- $\beta$  (MASSAGUÉ; CHEN, 2000). Há três classes de Smad: (1) receptores regulados por Smads (R-Smads), constituído por Smad 1, 2, 3, 5 e 8; (2)

mediador comum (co-Smad) Smad4; (3) Smad antagonista ou inibitório, Smad6 e 7 (KISSELEVA; BRENNER, 2008; ARCINIEGAS et al., 2007). A via de sinalização citada é regulada por diversos *loops* de *feedback* auto-inibitórios, como por exemplo, Smad7 (ONICHTCHOUK et al., 1999; BREITKOPF et al., 2006) (Figura 7). Além disso, o TGF- $\beta$  pode afetar numerosas vias de transdução de sinal de uma maneira Smad-independente.

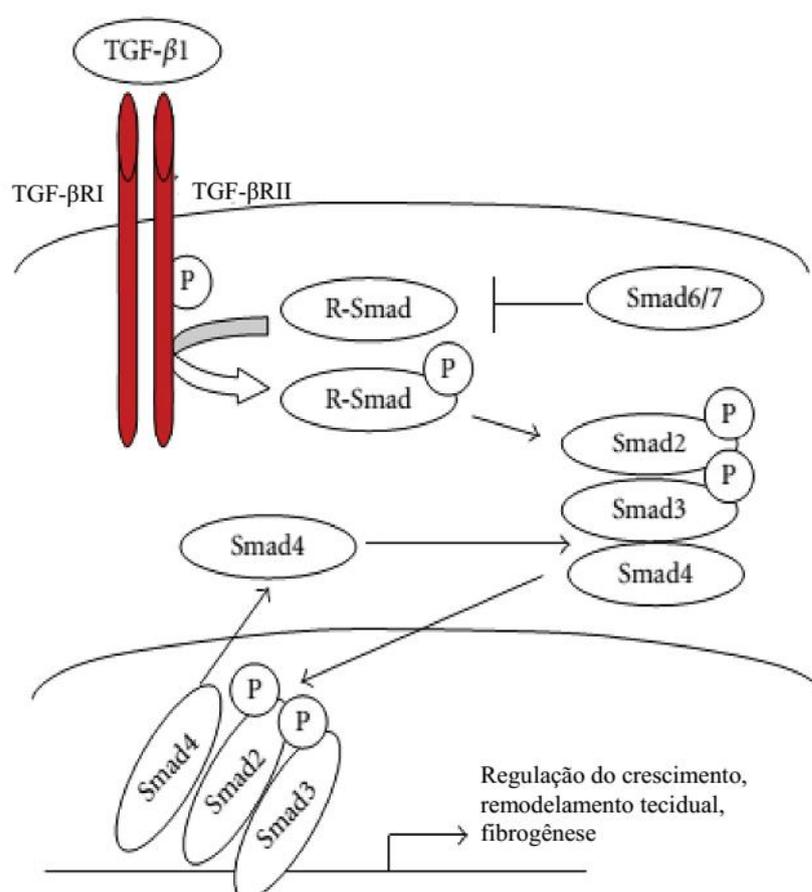


Figura 7: Sinalização de TGF- $\beta$ 1 (Fonte: adaptado de CONG et al., 2012).

O TGF- $\beta$  controla a transcrição de genes que codificam integrinas em diversos tipos celulares e tecidos, assim como em vários cânceres humanos. Ele também regula a expressão de ligantes de integrinas e estimula a expressão de proteínas associadas à integrina, o que poderia aumentar a ativação desta (FRANSVEA et al., 2009). Por outro lado, os efeitos regulatórios das integrinas sobre a atividade do

TGF- $\beta$  parecem envolver, primariamente, integrinas contendo a subunidade  $\alpha v$ . Sabe-se que, miofibroblastos teciduais, células efectoras dominante durante o processo de fibrose, expressam múltiplas integrinas contendo a subunidade  $\alpha v$  (HENDERSON; SHEPPARD, 2013).

Outro importante fator envolvido na fibrose hepática é o fator de crescimento derivado de plaqueta (PDGF), que se liga a receptores da família tirosina quinase, os quais coletivamente são transdutores chaves para muitas citocinas, incluindo fator de crescimento de hepatócito, fator de crescimento epidermal, entre outras (VOGEL et al., 1997). O PDGF é o mitógeno melhor caracterizado e mais potente para as células estreladas. A regulação positiva de seus receptores após uma lesão hepática aumenta a responsividade ao PDGF autócrino, o qual também possui sua expressão elevada (PINZANI, 2002).

A família PDGF é constituída por quatro cadeias polipeptídicas distintas, codificadas por quatro genes diferentes. A combinação das cadeias originam 5 isoformas: PDGF-AA, PDGF-AB, PDGF-BB, PDGF-CC e PDGF-DD. Estas são formadas, então, por duas cadeias polipeptídicas antipararelas ligadas por pontes dissulfetos através de homo ou heterodimerização (HELDIN; ERIKSSON; OSTMAN, 2002). As isoformas de PDGF agem a partir da interação com receptores PDGFR $\alpha$  e PDGFR $\beta$  que requerem dimerização para a ligação do ligante e posterior sinalização, apresentando, então, três possíveis combinações:  $\alpha\alpha$ ,  $\alpha\beta$  e  $-\beta\beta$ . O PDGF-A ativa exclusivamente o receptor PDGFR- $\alpha$ , enquanto o PDGF-B é capaz de ativar PDGFR $\alpha$ , PDGFR $\alpha\beta$  e PDGFR $\beta$ . PDGF-AB e PDGF-C ativam PDGFR $\alpha$  e PDGFR $\alpha\beta$ , enquanto PDGF-D preferencialmente ativa PDGFR $\beta$  (BETSHOLTZ, 2003). Ambos receptores são estruturalmente similares e ativam vias de transdução de sinal sobrepostas, incluindo fosfatidilinositol-3-quinase, Ras-MAPK, família Src de

quinases e fosfolipase C $\gamma$  (TROJANOWSKA, 2008). Estas vias podem afetar várias funções celulares, incluindo crescimento, proliferação e diferenciação celular.

No fígado, foi evidenciado que a expressão de PDGF-B e seus receptores estava aumentada tanto na fibrose experimental em ratos (PINZANI et al., 1994), como em fígado humano (PINZANI et al., 1996). Em 2006, Czochra et al. demonstraram *in vivo* que a expressão aumentada de PDGF-B tinha como consequência a fibrose hepática. O PDGF-B tem sido considerado o mitógeno mais importante para células estreladas (PINZANI et al., 2002; BREITKOPF et al., 2005; LAU et al., 2005), no entanto, Thieringer et al. (2008) também evidenciaram que o PDGF-A possui influência no desenvolvimento da fibrose hepática por regular positivamente a expressão de TGF- $\beta$ 1, o qual é um potente ativador de células estreladas.

Embora existam diferentes fontes secretoras das citocinas pró-fibrogênicas, as plaquetas são as principais fontes de TGF- $\beta$  latente na circulação, estando também envolvidas na ativação deste através da liberação de uma pró-proteína *furin-like* convertase (BLAKYTNY et al., 2004). Os membros da família TGF- $\beta$  são secretados em uma forma inativa (latente) em um complexo com duas proteínas – LAP e LTBP. Sua ativação requer a dissociação do complexo, o que ocorre em baixo pH ou através da ação de espécies reativas de oxigênio, proteases, trombospondina 1 ou diversas integrinas. Tanto o TGF- $\beta$ 1 como a LAP contêm um motivo proteico conservado constituído pela sequência arginina – glicina – ácido aspártico (RGD) que pode se ligar às integrinas  $\alpha\beta$ 1,  $\alpha\beta$ 3,  $\alpha\beta$ 5,  $\alpha\beta$ 6,  $\alpha\beta$ 8,  $\alpha$ 5 $\beta$ 1,  $\alpha$ 8 $\beta$ 1 e, também à integrina  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 (GPIIb-IIIa), presente na membrana plaquetária (GRAINGER et al., 1995; HAYASHI; SAKAI, 2012). Duas dessas integrinas ( $\alpha\beta$ 6,

$\alpha v\beta 8$ ) ligam-se e eficientemente ativam TGF- $\beta 1$  e  $-\beta 3$  latentes (MUNGER et al., 1999; ANNES et al., 2002; MU et al., 2002; ARAYA et al., 2006).

Da mesma forma, as plaquetas são importantes fontes de PDGF pela degranulação, processo que ocorre após injúria e, o PDGF, assim como o TGF- $\beta 1$ , atua na modulação do processo de cicatrização de ferida (GRAINGER et al., 1995).

As integrinas também já foram relacionadas ao PDGF, o qual vem se mostrando um estímulo regulatório para a expressão da subunidade  $\alpha 2$  (AHLEN; RUBINS, 1994; XU; CLARK, 1996). Estudo experimental em ratos demonstrou que a atividade sinérgica da integrina  $\alpha v\beta 3$  e do receptor PDGF aumenta a migração de células endoteliais microvasculares (WOODARD et al., 1997).

De maneira análoga às plaquetas, as células estreladas do fígado, responsáveis pelo desenvolvimento da fibrose expressam diversas integrinas, incluindo  $\alpha 1\beta 1$ ,  $\alpha 2\beta 1$ ,  $\alpha 5\beta 1$ ,  $\alpha v\beta 1$ ,  $\alpha v\beta 3$  e  $\alpha 6\beta 4$  (RACINE-SAMSON; ROCKEY; BISSEL, 1997; BATALLER; BRENNER, 2005; GAO; BRIGSTOCK, 2004).

Integrinas são glicoproteínas heterodiméricas transmembranas, constituídas por duas subunidades, uma alfa ( $\alpha$ ) e outra beta ( $\beta$ ) associadas não covalentemente entre si (DIPERSIO et al., 1997). Muitos membros da família das integrinas reconhecem um motivo comum presente em seus ligantes, entre eles o melhor estudado é a sequência arginina – glicina – ácido aspártico (Arg-Gly-Asp), também conhecido como sítio universal de reconhecimento (RGD) (HAUBNER; FINSINGER; KESSLER; 1997; ARNAOUT, GOODMAN et al., 2002; XIONG et al., 2002). As integrinas são receptores transmembrana de proteínas da matriz extracelular e de superfície de células que conectam a matriz ao citoesqueleto celular, desempenhando, desta forma, um papel importante na adesão, migração celular, montagem de matriz de fibronectina, transdução de sinais, diferenciação,

desenvolvimento embrionário, respostas imunológicas, manutenção da estrutura celular, cicatrização de ferimentos e metástase tumoral (BROWN; YAMADA, 1995; PARK et al., 2000; MURAMATSU et al., 2004).

As integrinas possuem como função principal mediar a adesão celular à matriz extracelular. No entanto, elas também transmitem sinais de entrada da matriz extracelular para a maquinaria de sinalização intracelular em resposta à interação de um ligante, processo este chamado de “sinalização de fora para dentro” (PLOW et al., 2000). Por outro lado, a sinalização intracelular ativada por outros receptores pode induzir mudanças conformacionais nas integrinas, alterando assim sua atividade funcional, o que é conhecido como “sinalização de dentro para fora” (LUO; CARMAN; SPRINGER, 2007). Assim, as integrinas e os receptores tirosina quinase (RTK – *receptor tyrosine kinase*) podem trocar ou amplificar suas vias de sinalização tanto pela via “de fora para dentro” como pela “de dentro para fora”.

Os eventos de sinalização induzidos pelas interações integrina-matriz extracelular incluem Ras, fosfoinositol-3-quinase (PI3 quinase), MAP quinase, quinase de adesão focal (FAK – *focal adhesion kinase*), Src, Akt, quinase ligada à integrina (ILK – *integrin-linked kinase*), Abl e Rac, Rho, e cdc42 pequenas GTPases (BRYAN; D'AMORE, 2007; KANDA; KANETAKE; MIYATA, 2007; RIDLEY, 2000; SCHWARTZ; SHATTIL, 2000). Além disso, as interações integrina-matriz induzem a fosforilação de resíduos chaves de tirosina das subunidades da integrina, como  $\beta 3$  e  $\beta 4$ , o que resulta no recrutamento de moléculas adaptadoras de sinal como Shc, Shp-2 e Crk (BERTOTTI; COMOGLIO; TRUSOLINO, 2006; KLEMKE et al., 1998; COLLINS et al., 1999). Estas não somente transmitem os sinais dependentes de integrina, mas também contribuem para a “conversa cruzada” com outros receptores de sinalização, incluindo os RTKs (MARIOTTI et al., 2001; MORO et al., 2002;

MAHABELESHWAR et al., 2007). Eventos de sinalização intracelulares ativados pela ligação à integrina também são influenciados pela estimulação de fatores de crescimento. De fato, interações integrina-matriz extracelular amplificam significativamente eventos de sinalização mediados por fatores de crescimento (SOMANATH et al., 2007), o que sugere que a sinergia entre as sinalizações da integrina e RTK poderia maximizar as respostas bioquímicas.

Estudos já demonstraram que a integrina  $\alpha\beta3$  se associa com receptor de IGF (*insulin-like growth factor* ou fator de crescimento semelhante à insulina), de PDGF (SCHNELLER; VUORI; RUOSLAHTI, 1997; BORGES; JAN; RUOSLAHTI, 2000) e com o receptor de VEGFR-2 (*vascular endothelial growth factor receptor-2* ou receptor 2 do fator de crescimento vascular endotelial) (SOLDI et al., 1999). Além disso, a estimulação de fatores de crescimento nos RTKs ou nas interações integrina-matriz extracelular induz um aumento da concentração local de integrinas e RTKs nas adesões focais (LIPSCOMB; MERCURIO, 2005). Como as integrinas reúnem grandes complexos de sinalização e ativam múltiplas vias de sinalização, elas podem servir como uma classe de reguladores da função celular (GIANCOTTI, RUOSLAHTI, 1999).

Vários tipos celulares expressam integrinas em sua membrana celular, entre elas as plaquetas. Estas já foram associadas com o carreamento do VHC (PUGLIESE et al., 2004) e, conseqüente, disseminação do vírus pelo organismo. No entanto, as plaquetas não expressam em sua superfície o principal receptor envolvido na entrada do vírus nos hepatócitos (HAMAIA; LI; ALLAIN, 2001). Estudos vêm sendo realizados buscando associar outras proteínas à interação do vírus com as plaquetas (PUGLIESE et al. 2004) e, candidatas a esta função poderiam ser algumas glicoproteínas da família das integrinas, como os complexos proteicos

GPIa-IIa e GPIIb-IIIa expressos na superfície da plaqueta (WATSON; GIBBINS, 1998).

Em alguns destes complexos glicoproteicos da membrana plaquetária residem determinantes antigênicos polimórficos denominados antígenos plaquetários humanos, do inglês *Human Platelet Antigens* (HPAs). Foram definidos 24 antígenos específicos de plaqueta, sendo que 12 deles estão agrupados em seis sistemas bialélicos (HPA-1 ao -5, e -15) (METCALFE, 2004). Nestes casos, o polimorfismo do antígeno plaquetário (HPA) ocorre devido à substituição de um único aminoácido na proteína, consequência da troca de um único nucleotídeo no gene. Estas alterações de aminoácido podem conduzir a modificações conformacionais na estrutura tridimensional da glicoproteína e, conseqüentemente, influenciar sua função. Dentro de cada sistema HPA, o alelo de alta frequência recebe a designação “a” e o de baixa frequência “b” (METCALFE, 2003).

O polimorfismo dos HPAs já foi associado a doenças envolvendo plaquetas, como púrpura trombocitopênica neonatal e púrpura pós-transfusional (KUNICKI; NEWMAN, 1992). No entanto, a associação dos HPAs com doenças não tem sido restrita a distúrbios plaquetários (INIESTA et al., 2004). Intercorrências pós-transplante de *stem-cell* hematopoiética (GARCÍA-MALO et al., 2004) e agressividade em câncer (AYALA et al., 2003) são exemplos. O polimorfismo do sistema HPA-5 foi associado com a infecção pelo VHC, uma vez que pacientes portadores do vírus apresentavam maior frequência do alelo HPA -5b (VERDICHIO-MORAES et al., 2009). Além disso, Silva e al. (2012) associaram o polimorfismo do sistema HPA-1 com resposta ao tratamento e progressão da fibrose em indivíduos infectados pelo VHC.

Assim, o maior conhecimento no que se refere ao processo de progressão da doença hepática e, sua correlação com fatores virais e do hospedeiro devem ser conduzidos para melhor compreensão da doença e sua evolução no paciente infectado.

## REFERÊNCIAS

- ABDEL-HAKEEM, M.S.; SHOUKRY, N.H. Protective immunity against hepatitis C: many shades of gray. **Front. Immunol.**, v.5, jun. 2014.
- AGNELLO, V. et al. Hepatitis C virus and other Flaviviridae viruses enter cells via low density lipoprotein receptor. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.96, n.22, p.12766-12771, out. 1999.
- AHLÉN, K.; RUBIN, K. Platelet-derived growth factor-BB stimulates synthesis of the integrin  $\alpha 2$ -subunit in diploid fibroblasts. **Exp. Cell Res.**, v.215, n.2, p.347-353, dez. 1994.
- ALTER, M. J. The epidemiology of acute and chronic hepatitis C. **Clin. Liver Dis.**, v.1, n.3, p.559-568, nov. 1997.
- AMORIN, R.M.S. et al. Hepatitis C virus genotypes in blood donors from the Federal District, Central Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v.99, n.8, p.895-897, dez. 2004.
- ANNES, J.P. et al. Integrin  $\alpha V\beta 6$ -mediated activation of latent TGF- $\beta$  requires the latent TGF- $\beta$  binding protein-1. **J. Cell Biol.**, v.165, n.5, p.723–734, jun. 2004.
- ARAYA, J. et al. Integrin-mediated transforming growth factor- $\beta$  activation regulates homeostasis of the pulmonary epithelial-mesenchymal trophic unit. **Am. J. Pathol.**, v.169, n.2, p.405–415, ago. 2006.
- ARCINIEGAS, E. et al. Perspectives on endothelial-to-mesenchymal transition: potential contribution to vascular remodeling in chronic pulmonary hypertension. **Am. J. Physiol. Cell Mol. Physiol.**, v.293, n.1, p. L1–L8, jul. 2007.

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

ASANO, Y. et al. Increased expression of integrin alpha(v)beta3 contributes to the establishment of autocrine TGF-beta signaling in scleroderma fibroblasts. **J. Immunol.**, v.175, n.11, p.7708–7718, dez. 2005.

ASK, K. et al. Progressive pulmonary fibrosis is mediated by TGF-beta isoform 1 but not TGF-beta3. **Int. J. Biochem. Cell Biol.**, v.40, n.3, p.484–495, 2008.

ATTISANO, L; WRANA, J.L. Signal transduction by members of the transforming growth factor-beta superfamily. **Cytokine Growth Factor Rev.**, v.7, n.4, p.327–339, dez. 1996.

AYLA, F. et al. Genetic polymorphisms of platelet adhesive molecules: association with breast cancer risk and clinical presentation. **Breast Cancer Res. Treat.**, v.80, n.2, p.145-154, jul 2003.

BACHEM, M.G. et al. Activation of rat liver perisinusoidal lipocytes by transforming growth factors derived from myofibroblastlike cells. A potential mechanism of self perpetuation in liver fibrogenesis. **J. Clin. Investig.**, v.89, n.1, p.19–27, jan. 1992.

BATALLER, R.; BRENNER, D.A. Liver fibrosis. **J. Clin. Invest.**, v.115, n.2, p.209-218, fev. 2005.

BERTOTTI, A.; COMOGLIO, P. M.; TRUSOLINO, L. Beta4 integrin activates a Shp2-Src signaling pathway that sustains HGF-induced anchorage-independent growth. **J. Cell Biol.**, v.175, n.6, p.993-1003, dez. 2006.

BETSHOLTZ, C. Biology of platelet-derived growth factors in development. **Birth Defects Res. C. Embryo Today**, v.69, n.4, p.272-85, nov. 2003.

BLAKYTNY, R. et al. Latent TGF- $\beta$ 1 activation by platelets. **J. Cell Physiol.**, v.199, n.1, p.67-76, abr. 2004.

BORGES, E.; JAN, Y.; RUOSLAHTI, E. Platelet-derived growth factor receptor beta and vascular endothelial growth factor receptor 2 bind to the beta 3 integrin through its extracellular domain. **J. Biol. Chem.**, v.275, n.51, p.39867-39873, dez. 2000.

BORTHWICK, L.A.; WYNN, T.A.; FISHER, A.J. Cytokine mediated tissue fibrosis. **Biochim. Biophys. Acta.**, v.1832, n.7, p.1049-1060, jul. 2013.

BRASIL. Ministério da Saúde. Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais. **Novo medicamento para hepatite C é liberado pela Anvisa**, Brasília, DF, 30 mar. 2015. Disponível em: <<http://www.aids.gov.br/noticia/2015/novo-medicamento-para-hepatite-c-e-liberado-pela-anvisa>>. Acesso em: 25 abr. 2015.

BRASIL. Ministério da Saúde. Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais. **Boletim epidemiológico hepatites virais**, Brasília, DF, 2012. Disponível em: <<http://www.aids.gov.br/pagina/boletim-epidemiologico>>. Acesso em: 17 maio 2015.

BRASIL. Ministério da Saúde. Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais. **Suplemento 1 – Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para Hepatite C e Coinfecções – Manejo do paciente infectado cronicamente pelo genótipo 1 do HCV e fibrose avançada**. 2013. Brasília. Disponível em: <<http://www.aids.gov.br/pagina/publicacoes>>. Acesso em: 20 mar. 2014.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Suplemento 1 – Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para Hepatite C e Coinfecções**. 2011. Brasília. Disponível em: <<http://www.aids.gov.br/pagina/publicacoes>>. Acesso em: 20 mar. 2014.

BREITKOPF, K. et al. Expression patterns of PDGF-A, -B, -C and -D and the PDGF-receptors alpha and beta in activated rat hepatic stellate cells (HSC). **Cytokine**, v.31, n.5, p.349–357, set. 2005.

BREITKOPF, K. et al. TGF- $\beta$ /Smad signaling in the injured liver. **Z. Gastroenterol.**, v.44, n.1, p.57–66, jan. 2006.

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

BRUNO, S. et al. Hepatitis C virus genotypes and risk of hepatocellular carcinoma in cirrhosis: a prospective study. **Hepatology**, v.25, n.3, p.754-758, mar. 1997.

BRYAN, B.A.; D'AMORE, P.A. What tangled webs they weave: Rho-GTPases control of angiogenesis. **Cell Mol Life**, v.64, n.16, p.2053-65, ago. 2007.

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

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

CHARLTON, M. Hepatitis C infection in liver transplantation. **Am. J. Transplant.**, v.1, n.3, p.197-203, set. 2001.

COLLINS, L. R. et al. Bifurcation of cell migratory and proliferative signaling by the adaptor protein Shc. **J. Cell Biol.**, v.147, n.7, p.1561-1568, dez. 1999.

CONG, M. et al. Cell signals influencing hepatic fibrosis. **Int. J. Hepatol.**, v.2012, p. 2012; 158547, 2012.

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

CZEPIEL, J.; BIESIADA, G.; MACH, T. Viral hepatitis C. **Pol Arch Med Wewn.**, v.118, n.12, p.734-740, dez. 2008.

CZOCHRA, P. et al. Liver fibrosis induced by hepatic overexpression of PDGF-B in transgenic mice. **J. Hepatol.**, v. 45, n.3, p.419-428, set. 2006.

DE MINICIS, S. et al. Gene expression profiles during hepatic stellate cell activation in culture and in vivo. **Gastroenterology**, v.132, n.5, p.1937–1946, maio 2007.

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

DOOLEY, S. et al. Modulation of transforming growth factor beta response and signaling during transdifferentiation of rat hepatic stellate cells to myofibroblasts. **Hepatology**, v.31, n5, p. 1094–1106, maio 2000.

DRANOFF, J.A.; WELLS, R.G. Portal fibroblasts: Undeappreciated mediators of biliary fibrosis. **Hepatology**, v.51, n.4, p. 1438-1444, abr. 2010.

EVANS, M.J. et al. Claudin-1 is a hepatitis C virus co-receptor required for a late step in entry. **Nature**, v.446, n.7131, p.801-805, abr. 2007.

EYSTER, M.E. et al. Natural history of hepatitis C virus infection in multitransfused hemophiliacs: effect of coinfection with human immunodeficiency virus. The Multicenter Hemophilia Cohort Study. **J. Acquir. Immune Defic. Syndr.**, v.6, n.6, p. 602–610, jun 1993.

FÉNÉANT, L.; LEVY, S.; COCQUEREL, L. CD81 and hepatitis C virus (HCV) infection. **Viruses**, v.6, n.2, p.535–572, fev. 2014.

FORBES, S.J.; PAROLA, M. Liver fibrogenic cells. **Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.**, v.25, n.2, p.207-217, abr. 2011.

FRANSVEA, E. et al. Targeting transforming growth factor (tgF)- $\beta$ ri inhibits activation of  $\beta$ 1 integrin and blocks vascular invasion in hepatocellular carcinoma. **Hepatology**, v.49, n.3,p.839–850, mar 2009.

FRAQUELLI, M. et al. Reproducibility of transient elastography in the evaluation of liver fibrosis in patients with chronic liver disease. **Gut**, v.56, n.7, p.968-973, jul. 2007.

FREEMAN, A.J. et al. Estimating progression to cirrhosis in chronic hepatitis C virus infection. **Hepatology**, v. 34, p.809-816.

FRIED, M.W. et al. Peginterferon alfa-2a plus ribavirin for chronic Hepatitis C virus infection. **N. Engl. J. Med.**, v.347, n.13, p.975-982, set. 2002.

FRIEDMAN, S.L. Hepatic stellate cells: protean, multifunctional, and enigmatic cells of the liver. **Physiol Rev.**, v.88, n.1, p.125-172, 2008b.

FRIEDMAN, S.L. Mechanisms of hepatic fibrogenesis. **Gastroenterology**, v.134, n.6, p.1655-1669, maio 2008a.

FRIEDMAN, S.L. Molecular regulation of hepatic fibrosis, an integrated cellular response to tissue injury. **J. Biol. Chem.**, v.275, n.4, p.2247–2250, jan. 2000.

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 heparan sulfate proteoglycan. **J. Biol. Chem.**, v.279, n.10, p. 8848–8855, mar. 2004.

GARCÍA-MALO, M.D. et al. Human platelet antigen systems in allogeneic peripheral blood progenitor cell transplantation: effect of human platelet antigen mismatch on platelet engraftment and graft-versus-host disease. **Transfusion**, v.44, n.5, p.771-776, maio 2004.

GE, D. et al. Genetic variation in IL28B predicts hepatitis C treatment-induced viral clearance. **Nature**, v.461, n.7262, p.399-401, set. 2009.

GIANCOTTI, F. G. AND RUOSLAHTI, E. Integrin signaling. **Science**, v.285, n.5430, p.1028-1032, ago. 1999.

GRAINGER, D. J. et al. Release and activation of platelet latent TGF-beta in blood clots during dissolution with plasmin. **Nat. Med.**, v.1, n.9, p.932-937, set. 1995.

GRESSNER, A.M. et al. Roles of TGF-beta in hepatic fibrosis. **Front Biosci.**, v.7, p. D793–807, abr. 2002.

GUHA, I.N.; ROSENBERG, W.M. Noninvasive assessment of liver fibrosis: serum markers, imaging, and other modalities. **Clin. Liver Dis.**, v.12, n.4, p.883-900, nov. 2008.

GUO, X.; CHEN, S.Y. Transforming growth factor-beta and smooth muscle differentiation. **World J. Biol. Chem.**, v.3, n.3, p.41–52, mar. 2012.

HAMAIA, S.; LI, C.; ALLAIN, J.P. The dynamics of hepatitis C virus binding to platelets and 2 mononuclear cell lines. **Blood**, v.98, n.8, p.2293-2300, out. 2001.

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

HAURI, A.M.; ARMSTRONG, G.L.; HUTIN, Y.J. The global burden of disease attributable to contaminated injections given in health care settings. *Int. J. STD AIDS*, v.15, n.1, p.7-16, jan. 2004.

HELDIN, C.H.; ERIKSSON, U.; OSTMAN, A. New members of the platelet-derived growth factor family of mitogens. **Arch. Biochem. Biophys.**, v.398, n.2, p.284–290, fev. 2002.

HELLE, F.; DUBUISSON, J. Hepatitis C virus entry into host cells. **Cell Mol. Life Sci.**, v.65, n.1, p.100-112, jan. 2008.

HENDERSON, N.C.; SHEPPARD, D. Integrin-mediated regulation of TGF $\beta$  in fibrosis. **Biochim. Biophys. Acta.**, v.1832, n.7, p. 891-896, jul. 2013.

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

HERNANDEZ-GEA, V.; FRIEDMAN, S.L. Pathogenesis of liver fibrosis. **Annu. Rev. Pathol.**, v.6, p.425-456, 2011.

INIESTA, J.A. et al. Platelet GP IIIa polymorphism HPA-1 (PIA) protects against subarachnoid hemorrhage. **Stroke**, v.35, n.10, p.2282-2286, out. 2004.

IREDALE, J. et al. Mechanisms of spontaneous resolution of rat liver fibrosis. Hepatic stellate cell apoptosis and reduced hepatic expression of metalloproteinase inhibitors. **J. Clin. Invest.**, v.102, n.3, p.538-549, ago. 1998.

IREDALE, J.P.; THOMPSON, A.; HENDERSON, N.C. Extracellular matrix degradation in liver fibrosis: Biochemistry and regulation. **Biochim. Biophys. Acta**, v.1832, n.7, p.876–883, jul. 2013.

KANDA, S.; KANETAKE, H.; MIYATA, Y. Role of Src in angiopoietin 1-induced capillary morphogenesis of endothelial cells: effect of chronic hypoxia on Src inhibition by PP2. **Cell Signal**, v.19, n.3, p.472-80, mar. 2007.

KISSELEVA, T. et al. Myofibroblasts revert to an inactive phenotype during regression of liver fibrosis. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A**, v.109, n.24, p.9448–9453, jun. 2012.

KISSELEVA, T.; BRENNER, D.A. Mechanisms of fibrogenesis. **Exp. Biol. Med.**, v.233, n.2, p.109–122, fev. 2008.

KLEMKE, R. L. et al. CAS/Crk coupling serves as a "molecular switch" for induction of cell migration. **J. Cell Biol.**, v.140, n.4, p.961-972, fev. 1998.

KONG, L. et al. Hepatitis C virus E2 envelope glycoprotein core structure. **Science**, v.342, n.6162, p.1090–1094, nov. 2013.

KRIZHANOVSKY, V. et al. Senescence of activated stellate cells limits liver fibrosis. **Cell**, v.134, n.4, p.657–667, ago. 2008.

KUMAR, V.; ABBAS, AK.; FAUSTO, N. Tissue renewal and repair: regeneration, healing, and fibrosis. In: \_\_\_\_\_. **Pathologic Basis of Disease**. Philadelphia: Elsevier Saunders, 2005. p. 87-118.

KUNICKI, T.J.; NEWMAN, P.J. The molecular immunology of human platelet proteins. **Blood.**, v.80, n.6, p.1386-1404, set. 1992.

LAU, D.T. et al. Intrahepatic gene expression profiles and alpha-smooth muscle actin patterns in hepatitis C virus induced fibrosis. **Hepatology**, v.42, n.2, p.273–281, ago. 2005.

LETTERIO, J.J.; ROBERTS, A.B. Regulation of immune responses by TGF-beta. **Annu. Rev. Immunol.**, v.16, p.137–161, 1998.

LEV, P.R. et al. PDGF-A, PDGF-B, TGF $\beta$ , and bFGF mRNA levels in patients with essential thrombocythemia treated with anagrelide. **Am J Hematol.**, v.78, n.2, p.155-7, fev.2005.

LI, J.T. et al. Molecular mechanism of hepatic stellate cell activation and antifibrotic therapeutic strategies. **J. Gastroenterol.**, v.43, n.6, p.419-428, jul. 2008.

LI, M.O. et al. Transforming growth factor-beta regulation of immune responses. **Annu. Rev. Immunol.**, v.24, p.99–146, 2006.

LINDENBACH, B.D.; RICE, C.M. Unravelling hepatitis C virus replication from genome to function. **Nature**, v.436, n.7053, p.933-938, ago. 2005.

LIPSCOMB, E.A.; MERCURIO, A. M. Mobilization and activation of a signaling competent alpha6beta4integrin underlies its contribution to carcinoma progression. **Cancer Metastasis Rev.**, v.24, n.3, p.413-423, set. 2005.

LIU, C. et al. Smads 2 and 3 are differentially activated by transforming growth factor-beta (TGF-beta) in quiescent and activated hepatic stellate cells. Constitutive nuclear localization of Smads in activated cells is TGF-beta-independent. **J Biol Chem.**, v.278, n.13, p. 11721–11728, mar. 2003.

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, fev. 2009.

LUO, B.H.; CARMAN, C.V.; SPRINGER, T.A. Structural basis of integrin regulation and signaling. **Annu. Rev. Immunol.**, v.25, p.619-647, 2007.

MAHABELESWAR, G. H. et al. Mechanisms of integrin-vascular endothelial growth factor receptor cross-activation in angiogenesis. **Circ. Res.**, v.101, p.570-580.

MALLAT, A.; LOTERSZTAJN, S. Cellular mechanisms of tissue fibrosis. 5. Novel insights into liver fibrosis. **Am. J. Physiol.**, v.305, n.8, p.C789–C799, out. 2013.

MANNS, M.P.; WEDEMEYER, H.; CORNBERG, M. Treating viral hepatitis C: Efficacy, side effects, and complications. **Gut**, v.55, n.9, p.1350–1359, set. 2006.

MARIOTTI, A. et al. EGF-R signaling through Fyn kinase disrupts the function of integrin alpha6beta4 at hemidesmosomes: role in epithelial cell migration and carcinoma invasion. **J. Cell Biol.**, v.155, n.3, p.447-458, out. 2001.

MARRA, F. et al. Cultured human liver fat-storing cells produce monocyte chemotactic protein-1. Regulation by proinflammatory cytokines. **J. Clin. Invest.**, v.92, n.4, p.1674 –1680, out. 1993.

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

MASSAGUÉ, J.; CHEN, Y.G. Controlling TGF- $\beta$  signaling. **Genes Dev.**, v.14, n.6, p.627-644, mar. 2000.

MCGUIRE, R.F. et al. Role of extracellular matrix in regulating fenestrations of sinusoidal endothelial cells isolated from normal rat liver. **Hepatology**, v.15, n.6, p.989-997, jun. 1992.

MEDERACKE, I. et al. Fate tracing reveals hepatic stellate cells as dominant contributors to liver fibrosis independent of its aetiology. **Nat. Commun.**, v.4, p. 2823, 2013.

MESSINA, J.P. et al. Global distribution and prevalence of hepatitis C virus genotypes. **Hepatology**, v.61, n.1, p.77-87, jan. 2015.

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

METCALFE, P. Platelet antigens and antibody detection. **Vox Sang.**, v.87, n.1, p.82-6, jul. 2004.

MOHD HANAFIAH, K. et al. Global epidemiology of hepatitis C virus infection: new estimates of age-specific antibody to HCV seroprevalence. **Hepatology**, v.57, n.4, p.1333-1342, abr. 2013.

MORADPOUR, D. et al. Membrane association of the RNA-dependent RNA polymerase is essential for Hepatitis C Virus RNA replication. **J. Virol.**, v.78, n.23, p. 13278–13284, dez. 2004.

MORADPOUR, D.; PENIN, F. Hepatitis C virus proteins: from structure to function. **Curr. Top. Microbiol. Immunol.**, v. 369, p.113–142, 2013.

MORADPOUR, D.; PENIN, F.; RICE, C.M. Replication of hepatitis C virus. **Nat Rev Microbiol.**, v.5, n.6, p.453-463, maio 2007.

MORO, L. et al. Integrin-induced epidermal growth factor (EGF) receptor activation requires c-Src and p130Cas and leads to phosphorylation of specific EGF receptor tyrosines. **J. Biol. Chem.**, v.277, n.11, p. 9405-9414, mar 2002.

MU, D. et al. The integrin  $\alpha(v)\beta8$  mediates epithelial homeostasis through MT1-MMP-dependent activation of TGF- $\beta$ 1. **J. Cell Biol.**, v.157, n.3, p.493–507, abr. 2002.

MULLER, H.M. et al. Peripheral blood leukocytes serve as a possible extrahepatic site for hepatitis C virus replication. **J. Gen. Virol.**, v.74, n.4, p. 669-676, abr. 1993.

MUNGER, J.S. et al. The integrin  $\alpha\beta6$  binds and activates latent TGF $\beta$ 1: a mechanism for regulating pulmonary inflammation and fibrosis. **Cell**, v.96, n.3, p.319-328, fev. 1999.

MURAMATSU, H. et al.  $\alpha4\beta1$ - and  $\alpha6\beta1$ - integrins are functional receptors for midkine, a heparin-binding growth factor. **J. Cell. Sci.**, v.117, p.5405-5415, out. 2004.

MURPHY, D. G. et al. Use of sequence analysis of the NS5B region for routine genotyping of hepatitis C virus with reference to C/E1 and 5' untranslated region sequences. **J. Clin. Microbiol.**, v.45, n.4, p.1102-1112, abr. 2007.

MURPHY, D.G. et al. Hepatitis C virus genotype 7, a new genotype originating from central Africa. **J. Clin. Microbiol.**, v.53, n.3, p.967-972, mar. 2015.

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

NEJJARI, M. et al. Integrin up-regulation in chronic liver disease: Relationship with inflammation and fibrosis in chronic hepatitis C. **J. Pathol.**, v.195, n.4, p.473-481, nov. 2001.

ONICHTCHOUK, D. et al. Silencing of TGF- $\beta$  signalling by the pseudoreceptor BAMBI. **Nature**, v. 401, n. 6752, p.480-485, set. 1999.

PARDO, A.; SELMAN, M. Matrix metalloproteases in aberrant fibrotic tissue remodelling. **Proc. Am. Thorac. Soc.**, v.3, n.4, p.383-388, jun. 2006.

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

PAROLA, M.; MARRA, F.; PINZANI, M. Myofibroblast - like cells and liver fibrogenesis: Emerging concepts in a rapidly moving scenario. **Mol. Aspects Med.**, v.29, n.1-2, p.58-66, fev.-abr. 2008.

PARSONS, C.J.; TAKASHIMA, M.; RIPPE, R.A. Molecular mechanisms of hepatic fibrogenesis. **J. Gastroenterol. Hepatol.**, v.22, p.S79-84, jun. 2007.

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

PAWLOTSKY, J.M.; CHEVALIEZ S.; MCHUTCHISON, J.G. The hepatitis C virus life cycle as a target for new antiviral therapies. **Gastroenterology**, v.132, n.5, p.1979-1998, maio 2007.

PERSICO, M. et al. Diagnosis of chronic liver disease: reproducibility and validation of liver biopsy. **Am. J. Gastroenterol.**, v.97, n.2, p.491-492, fev. 2002.

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

PINZANI, M. et al. Expression of platelet-derived growth factor and its receptors in normal human liver and during active hepatic fibrogenesis. **Am. J. Pathol.**, v.148, n.3, p.785–800, mar. 1996.

PINZANI, M. et al. Expression of platelet-derived growth factor in a model of acute liver injury. **Hepatology**, v.19, n.3, p.701-707, mar. 1994.

PINZANI, M. PDGF and signal transduction in hepatic stellate cells. **Front Biosci.**, v.7, p. d1720–1726, ago. 2002.

PLOW, E. F. et al. Ligand binding to integrins. **J. Biol. Chem.**, v.275, n.29, p.21785-21788, jul. 2000.

POPOV, Y. et al. Integrin $\alpha$ 6 is a marker of the progression of biliary and portal liver fibrosis and a novel target for antifibrotic therapies. **J. Hepatol.**, v.48, n.3, p.453–464, mar. 2008.

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

POYNARD, T. et al. Viral hepatitis C. **Lancet**, v.362, n.9401, p.2095-2100, dez. 2003.

POYNARD, T.; BEDOSSA, P.; OPOLON, P. Natural history of liver fibrosis progression in patients with chronic hepatitis C. **Lancet**, v.349, n.9055, p.825-832, 1997.

PUGLIESE et al. HCV infective virions can be carried by human platelets. **Cell Biochem. Funct.**, v.22, n.6, p.353-358, nov. – dez. 2004.

RACINE-SAMSON, L.; ROCKEY, D.C.; BISSELL, D.M. The role of alpha1beta1 integrin in wound contraction. A quantitative analysis of liver myofibroblasts in vivo and in primary culture. **J. Biol. Chem.**, v.272, n.49, p.30911–30917, dez. 1997.

RATZIU, V. et al. Sampling variability of liver biopsy in nonalcoholic fatty liver disease. **Gastroenterology**, v.128, n.7, p.1898-1906, jun. 2005.

RAZAVI, H. et al. Chronic hepatitis C virus (HCV) disease burden and cost in the United States. **Hepatology**, v.57, n.6, p.2164-2170, jun. 2013.

REGEV, A. et al. Sampling error and intraobserver variation in liver biopsy in patients with chronic HCV infection. **Am. J. Gastroenterol.**, v.97, n.10, p.2614-2618, out. 2002.

RIDLEY, A. Rho GTPases. Integrating integrin signaling. **J. Cell Biol.**, v.150, n.4, F107-109, ago. 2000.

ROCKEY, D.C.; FRIEDMAN, S.L. **Hepatic fibrosis and cirrhosis**. In: BOYER, T.D.; WRIGHT, T.L.; MANNS, M.P. Editors (5th edition), *Zakim and Boyer's hepatology* vol.1, New York: Elsevier, 2006. p. 87–109.

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

ROSSELLI, M. et al. Beyond scoring: a modern interpretation of disease progression in chronic liver disease. **Gut**, v.62, n.9, p.1234-1241, set. 2013.

ROTH, W.K. et al. Yield of HCV and HIV-1 NAT after screening of 3.6 million blood donations in central Europe. **Transfusion**, v.42, n.7, p.862-868, jul. 2002.

SANDRIN, L. et al. Transient elastography: a new noninvasive method for assessment of hepatic fibrosis. **Ultrasound Med. Biol.**, v.29, n.12, p.1705-1713, dez. 2003.

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

SCHNABL, B. et al. The role of Smad3 in mediating mouse hepatic stellate cell activation. **Hepatology**, v.34, n.1, p. 89–100, jul. 2001.

SCHNELLER, M.; VUORI, K.; RUOSLAHTI, E. Alphavbeta3 integrin associates with activated insulin and PDGF beta receptors and potentiates the biological activity of PDGF. **EMBO J.**, v.16, n. 18, p.5600-5607, Set. 1997.

SCHUPPAN, D. et al. Matrix as a modulator of hepatic fibrogenesis. **Semin. Liver Dis.**, v.21, n.3, p.351-372, ago. 2001.

SCHUSTER, N.; KRIEGLSTEIN, K. Mechanisms of TGF- $\beta$ -mediated apoptosis. **Cell**, v.307, n.1, p.1-14, jan. 2002.

SCHWARTZ, M. A.; SHATTIL, S. J. Signaling networks linking integrins and rho family GTPases. **Trends Biochem. Sci.**, v.25, n.8, p.388-391, ago 2000.

SEEFF, L.B. et al. Complication rate of percutaneous liver biopsies among persons with advanced chronic liver disease in the HALT-C trial. **Clin. Gastroenterol. Hepatol.**, v.8, n.10, p.877-883, out. 2010.

SEEFF, L.B. Natural history of chronic hepatitis C. **Hepatology**, v.36, n.5, p.S35-46, nov. 2002.

SEKI, E. et al. CCR1 and CCR5 promote hepatic fibrosis in mice. **J. Clin. Invest.**, v.119, n.7, p.1858 –1870, jul. 2009.

SEKI, E. et al. TLR4 enhances TGF- $\beta$  signaling and hepatic fibrosis. **Nat. Med.**, v.13, n.11, p.1324-1332, nov. 2007.

SHARMA, N.R. et al. Hepatitis C virus is primed by CD81 protein for low pH-dependent fusion. **J. Biol. Chem.**, v.286, n35, p.361–30376, set. 2011.

SILVA, G.F. et al. Human Platelet Antigen (HPA) genotype is associated with fibrosis progression in Chronic Hepatitis C. **J. Med. Virol.**, v.84, n.1, p.56-60, jan. 2012.

SIMMONDS, P. et al. Consensus proposals for a unified system of nomenclature of hepatitis C virus genotypes. **Hepatology**, v.42, n.4, p. 962–973, out. 2005.

SMITH, D.B. et al. Expanded classification of hepatitis C virus into 7 genotypes and 67 subtypes: update criteria and genotype assignment web resource. **Hepatology**, v.59, n.1, p.318-327, jan. 2014.

SOLDI, R. et al. Role of alphavbeta3 integrin in the activation of vascular endothelial growth factor receptor-2. **EMBO J.**, v.18, n.4, p.882-892, fev. 1999.

SOMANATH, P. R. et al. Akt1 signaling regulates integrin activation, matrix recognition, and fibronectin assembly. **J. Biol. Chem.**, v.282, n.31, p.22964-22976, ago. 2007.

TANAKA, H. et al. Hepatitis C virus 1b (II) infection and development of chronic hepatitis, liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma: a case-control study in Japan. **J. Epidemiol.**, v.8, n.4, p.244-249, out. 1998.

THIERINGER et al. Spontaneous hepatic fibrosis in transgenic mice overexpressing PDGF-A. **Gene**, v.423, n.1, p.23-28, out. 2008.

THOMAS, D.L. et al. The natural history of hepatitis C virus infection: host, viral, and environmental factors. **JAMA**, v.284, n.4, p.450–456, jul 2000.

TROEGER, J.S. et al. Deactivation of hepatic stellate cells during liver fibrosis resolution in mice. **Gastroenterology**, v.143, n.4, p.1073-1083, out. 2012.

TROJANOWSKA, M. Role of PDGF in fibrotic diseases and systemic sclerosis. **Rheumatology**, v.47, p. v2-4, out. 2008.

VERDICHIO-MORAES, C.F. et al. Allelic frequencies of HPA-1 to 5 human platelet antigens in patients infected with hepatitis C virus. **J. Med. Virol.**, v.81, n.4, p.757-759, abr. 2009.

VIEYRES, G. et al. Characterization of the envelope glycoproteins associated with infectious hepatitis C virus. **J. Virol.**, v.84, n.19, p.10159–10168, out. 2010.

VOGEL, W. et al. The discoidin domain receptor tyrosine kinases are activated by collagen. **Mol Cell.**, v.1, n.1, p.13-23, dez. 1997.

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

WAWRZYNOWICZ-SYCZEWSKA, M. et al. Natural history of acute symptomatic hepatitis type C. **Infection**, v.32, n.3, p.138-143, jun. 2004.

WELLS, R.G. Fibrogenesis. V. TGF-beta signaling pathways. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.**, v.279, n.5, p. G845–850, nov. 2000.

WELLS, R.G.; KRUGLOV, E.; DRANOFF, J.A. Autocrine release of TGF-beta by portal fibroblasts regulates cell growth. **FEBS Lett.**, v.559, n.1-3, p. 107–110, fev. 2004.

WELZEL, T.M. et al. Variants in interferon-alpha pathway genes and response to pegylated interferon-alpha2a plus ribavirin for treatment of chronic hepatitis C virus infection in the hepatitis C antiviral long-term treatment against cirrhosis trial. **Hepatology**, v.49, n.6, p.1847-1858, jun. 2009.

WINAU, F. et al. Ito cells are liver-resident antigen-presenting cells for activating T cell responses. **Immunity**, v.26, n.1, p.117–129, jan. 2007.

WOODARD, A.S. et al. The synergistic activity of  $\alpha_v\beta_3$  integrin and PDGF receptor increases cell migration. **J. Cell Sci.**, v.111, p. 469-478, fev. 1998.

WYNN, T.A. Cellular and molecular mechanisms of fibrosis. **J. Pathol.**, v.214, n.2, p.199-210, jan. 2008.

WYNN, T.A. IL-13 effector functions. **Annu. Rev. Immunol.**, v.21, p.425-456, 2003.

WYNN, T.A.; RAMALINGAM, T.R. Mechanisms of fibrosis: therapeutic translation for fibrotic disease. **Nat. Med.**, v.18, n.7, p.1028–1040, jul. 2012.

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

XU, J.; CLARK, R.A. Extracellular matrix alters PDGF regulation of fibroblast integrins. **J. Cell Biol.**, v.132, n.1-2, p.239-249, jan. 1996.

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, n.6, p.993-999, jun. 2004.

ZHANG, D.Y.; FRIEDMAN, S.L. Fibrosis-dependent mechanisms of hepatocarcinogenesis. **Hepatology**, v.56, n.2, p.769-775, ago. 2012.

## *Capítulo II*

---

*Artigo preparado para publicação*

**Avaliação dos fatores de crescimento  
TGF- $\beta$ 1 e PDGF na progressão da fibrose hepática em  
pacientes cronicamente infectados pelo  
Vírus da Hepatite C**

## RESUMO

A ativação de células estreladas hepáticas (HSC) é o principal evento que leva à fibrose nas doenças hepáticas crônicas, como a hepatite C. O TGF- $\beta$ 1 é a citocina fibrogênica mais potente para as HSCs e, o PDGF a mais mitogênica, tendo funções essenciais durante a fibrogênese. Integrinas, presentes em plaquetas e HSCs, também já foram relacionadas com a progressão da fibrose. Os polimorfismos de antígenos plaquetários humanos (HPA), residentes em integrinas, foram associados com a infecção e com a progressão da fibrose em pacientes VHC positivos. O objetivo do estudo foi avaliar a expressão de RNAm de TGF- $\beta$  e PDGF no tecido hepático e plaquetas de pacientes portadores da hepatite C e correlacionar os achados com o perfil HPA dos mesmos. Quarenta e sete pacientes foram agrupados de acordo com o grau de fibrose em G1 (n=23, F1 e F2) e G2 (n=24, F3 e F4). A expressão de RNAm dos fatores de crescimento no tecido hepático e nas plaquetas dos pacientes foi avaliada por q-PCR e o genótipo HPA-1 determinado pela técnica de PCR-SSP. A expressão gênica de TGF- $\beta$  e PDGF-A foi maior nas plaquetas do que no tecido hepático, diferentemente de PDGF-B que apresentou maior expressão no tecido. Não houve relação entre a expressão dos fatores de crescimento e o perfil HPA-1. Desta forma, os resultados desse estudo sugerem a existência de uma via alternativa para o desenvolvimento da fibrose mediada pela expressão aumentada de TGF- $\beta$ 1 e PDGF-A com origem megacariocítica e, conduzidos ao tecido hepático pelas plaquetas, contribuindo assim, com a ativação das HSCs e, conseqüentemente, com o processo de fibrogênese.

**Palavras-chave:** Plaqueta, PDGF, TGF- $\beta$ 1, Vírus da Hepatite C.

**ABSTRACT**

Activation of hepatic stellate cells (HSCs) is the primary event that leads to fibrosis in chronic liver diseases such as hepatitis C. TGF- $\beta$ 1 is the most pro-fibrogenic cytokine for HSCs and PDGF the most potent mitogen, so both have essential roles during fibrogenesis. Integrins, present on the cell surface of platelets and HSCs, have also been associated with fibrosis progression. Polymorphisms of human platelet antigens (HPA), which are located on integrins, have been associated with infection and progression of fibrosis in HCV-positive patients. The aim of this study was to evaluate the expression profile of TGF- $\beta$ 1 and PDGF mRNA on hepatic tissue and platelets from HCV carriers and correlate the findings with the HPA profile. Forty-seven patients were divided into two groups according to degree of fibrosis in G1 (n=23, F1 and F2) and G2 (n=24, F3 and F4). mRNA expression of growth factors in hepatic tissue and platelets was evaluated by qPCR and HPA-1 genotyped by PCR-SSP. TGF- $\beta$ 1 and PDGF-A mRNA expression was upregulated in platelets when comparing with liver tissue, differently from PDGF-B that was upregulated in liver tissue. There was no relationship between the expression of growth factors and HPA-1 profile. Thus, results from this study suggest that there is an alternative pathway for the development of fibrosis mediated by overexpression of TGF- $\beta$ 1 and PDGF-A of megakaryocytic origin and, secreted in the liver tissue by platelets, thereby contributing to the HSCs activation and, consequently, to the process of fibrogenesis.

**Keywords:** Platelet; PDGF, TGF- $\beta$ 1, Hepatitis C Virus.

## INTRODUÇÃO

O processo de fibrogênese hepática consequente à infecção crônica pelo Vírus da Hepatite C (VHC) caracteriza-se pelo acúmulo de matriz extracelular (ECM) no parênquima hepático, levando a uma substituição progressiva do tecido funcional pelo cicatricial (HERNANDEZ-GEA; FRIEDMAN, 2011).

Embora existam diferentes células relacionadas ao desenvolvimento da fibrose, as células estreladas do fígado (HSCs) são as principais envolvidas na síntese de proteínas da matriz extracelular (BACHEM et al., 1992). As HSCs regulam, por meio de sinalização celular, o processo de fibrogênese e em condições fisiológicas, expressam metaloproteinases (MMPs) que degradam a matriz extracelular evitando seu acúmulo no tecido (IREDALE; THOMPSON; HENDERSON, 2013).

Na fibrogênese, HSCs totalmente ativadas passam a expressar inibidores teciduais das metaloproteinases (TIMPs). Simultaneamente, ocorre inibição da expressão das MMPs, resultando no acúmulo de matriz extracelular no tecido (LOTERSZTAJN et al, 2005; IREDALE; THOMPSON; HENDERSON, 2013). A medida que proteínas da ECM não são degradadas e persistem no tecido hepático, estas promovem ativação das HSCs utilizando vias de sinalização celular mediadas por integrinas, importantes proteínas de adesão celular (ZHOU et al., 2004; ZHANG et al., 2006)

As vias de ativação das HSCs envolvem alguns sinais pró-fibrogênicos, como o fator de crescimento transformante-beta1 (TGF- $\beta$ 1) e fator de crescimento derivado de plaqueta (PDGF), ambos secretados por tipos celulares vizinhos, como células de Kupffer, hepatócitos, endotélio sinusoidal e plaquetas (FRIEDMAN, 2008; SEKI; SCHWABE, 2015). O TGF- $\beta$ 1 é a principal citocina pró-fibrogênica, acelerando a fibrose hepática pelo desencadeamento da transformação das HSCs e pela

participação na cascata de sinalização intracelular e regulação transcricional gênica (GRESSNER et al., 2002; PARSONS et al., 2007). Já o PDGF é o mitógeno mais potente para as HSCs (PINZANI, 2002).

Existem várias isoformas de PDGF (BETSHOLTZ, 2003), sendo o PDGF-B, a mais expressa na fibrose do tecido hepático, tanto em modelo experimental (PINZANI et al., 1994), quanto no homem (PINZANI et al., 1996). O PDGF-B tem sido considerado o mitógeno mais importante para células estreladas (PINZANI et al., 2002; BREITKOPF et al., 2005; LAU et al., 2005), mas Thieringer et al. (2008) também evidenciaram que o PDGF-A possui influência no desenvolvimento da fibrose hepática por regular positivamente a expressão de TGF- $\beta$ 1.

As plaquetas constituem importantes fontes de PDGF (GRAINGER et al., 1995) e de TGF- $\beta$  latente na circulação (BLAKYTNY et al., 2004), o qual pode ser ativado pela ação de integrinas (MUNGER et al., 1999; MU et al., 2002; ASANO et al., 2005; WIPFF et al., 2007).

As integrinas constituem proteínas expressas em diversos tipos celulares incluindo plaquetas e células estreladas do fígado (RACINE-SAMSON; ROCKEY; BISSEL, 1997; GAO; BRIGSTOCK, 2004; BATALLER; BRENNER, 2005). Algumas integrinas expressam determinantes antigênicos polimórficos denominados Antígenos Plaquetários Humanos (HPA), que já foram relacionados com a infecção pelo VHC (VERDICHIO-MORAES et al., 2009) e com progressão da fibrose em pacientes infectados pelo VHC (SILVA et al., 2012).

Assim, considerando que plaquetas constituem importantes fontes dos fatores de crescimento TGF- $\beta$ 1 e PDGF envolvidos no desenvolvimento da fibrose hepática na hepatite C crônica e que as integrinas fazem parte de vias pró-fibrogênicas, a finalidade deste trabalho foi avaliar a expressão gênica diferencial dos fatores de

crescimento TGF- $\beta$ 1, PDGF-A e -B no tecido hepático e nas plaquetas de pacientes portadores de hepatite C crônica com diferentes graus de fibrose hepática e correlacionar esses achados com o polimorfismo do sistema HPA -1.

## **CASUÍSTICA E MÉTODOS**

### **Casuística**

Participaram deste estudo 47 pacientes com hepatite C crônica atendidos pela Divisão de Gastroenterologia do Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina de Botucatu, Unesp selecionados de acordo com a ordem de entrada no serviço que obedecerem aos critérios de inclusão.

Critérios de inclusão: maiores de 18 anos, portadores de VHC genótipo 1, com biópsia hepática realizada em momento anterior à introdução da terapia, momento em que foram convidados a participar do estudo. Somente foram incluídos pacientes que forneceram seu consentimento livre e esclarecido por escrito.

Critérios de exclusão: gestantes, pacientes com idade inferior a 18 anos, pacientes com sorologia positiva para VHB ou HIV e/ou a presença de outras doenças hepáticas.

Para efeito de análise dos resultados, os pacientes foram divididos em dois grupos de acordo com o grau de fibrose determinado pela biópsia hepática. As biópsias foram analisadas utilizando o sistema METAVIR de classificação (POYNARD et al., 1997). Os grupos constituídos foram Grupo 1 (G1): pacientes VHC positivos com baixo grau de fibrose (F1, fibrose portal sem septos ou F2, com poucos septos) e Grupo 2 (G2): pacientes VHC positivos com fibrose avançada (F3, numerosos septos ou F4, cirrose).

Parâmetros como idade, sexo, consumo de álcool (definido como superior a 40g/dia para mulheres e 80g/dia para homens), grau de fibrose e genótipo viral foram retirados dos prontuários médicos dos pacientes incluídos no estudo.

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP e, realizado no Laboratório de Biologia Molecular, Divisão Hemocentro da mesma Instituição.

## **Amostras coletadas**

### **Amostras de Sangue**

De cada paciente foram coletados dois tubos de 5 mL de sangue total com EDTA, os quais foram encaminhados ao Laboratório de Biologia Molecular do Hemocentro de Botucatu, Faculdade de Medicina, Unesp, para separação de alíquotas de sangue total, plasma, *buffy coat* e plaquetas livres de plasma, as quais foram armazenadas a -80°C até o momento do processamento.

### **Amostras de Tecido**

As amostras de tecido hepático foram coletadas por profissional habilitado durante a realização da biópsia hepática de rotina, exame realizado segundo solicitação médica. As amostras coletadas de tecido hepático corresponderam ao excedente da coleta de rotina. Imediatamente após a coleta as amostras de tecido foram armazenadas em solução estabilizante de RNA, *RNAlater*® (*Life Technologies*, CA, USA) e congeladas a -80°C até o momento do processamento.

## **Metodologia**

### **Separação das Plaquetas**

A obtenção das plaquetas foi realizada a partir do plasma segundo metodologia descrita por Padovani et al. (2013).

### **Extração de DNA**

O DNA genômico foi isolado do sangue total utilizando o kit comercial *AxyPrep Blood Genomic DNA Miniprep Kit* (Axygen Biosciences, CA, USA), segundo especificações do fabricante.

### **Genotipagem HPA**

A genotipagem do sistema HPA-1 foi realizada pela metodologia PCR-SSP, segundo Klüter et al. (1996).

### **Extração de RNA do tecido**

RNA total do tecido hepático foi extraído utilizando o kit *SV Total RNA Isolation System* (Promega Corporation, WI, USA), segundo especificações do fabricante. A concentração do RNA e sua pureza foram avaliadas em espectrofotômetro, sendo consideradas adequadas amostras com concentração de RNA igual ou superior a 10 ng/ $\mu$ L e razão A260/A280 igual ou inferior a 2,0.

### **Extração de RNA da plaqueta**

RNA total da plaqueta foi isolado utilizando *Buffer RLT* (QIAGEN, Valencia, CA, USA), seguido pelo *QIAamp Viral RNA Mini Kit* (QIAGEN, Valencia, CA, USA), segundo as especificações do fabricante. A concentração do RNA e sua pureza

foram medidas no espectrofotômetro, sendo consideradas adequadas amostras com concentração de RNA igual ou superior a 40 ng/ $\mu$ L e razão A260/A280 igual ou inferior a 2,0.

### **Transcrição Reversa**

O DNA complementar (cDNA) foi obtido a partir do RNA extraído do tecido hepático e da plaqueta utilizando o *High-Capacity cDNA Archive kit* (Life Technologies, CA, USA), segundo as especificações do fabricante.

### **PCR quantitativa (qPCR)**

Para avaliar a expressão relativa do RNAm de TGF $\beta$ -1, PDGF-A e PDGF-B no tecido hepático e na plaqueta, o cDNA obtido foi submetido à Reação de PCR em Tempo Real (qPCR) utilizando o sistema *TaqMan Universal PCR Master Mix* (Life Technologies, CA, USA), sendo os *primers* e sondas tanto para os genes alvo (*TGF- $\beta$ 1*, *PDGFA* e *PDGFB*), quanto para o gene de referência *ACTB* ( $\beta$ -Actina) disponíveis comercialmente (Life Technologies, CA, USA). Os valores das amostras foram normalizadas pela razão entre os genes alvos (*TGF- $\beta$ 1*, *PDGFA* e *PDGFB*) e o gene de referência ( $\beta$ -Actina), sendo as quantificações realizadas em duplicata.

A quantificação relativa de RNA em cada amostra no tecido hepático e na plaqueta foi realizada utilizando como controle um *pool* de RNA extraído de tecido hepático proveniente de paciente com hepatite C crônica, não tratado, com VHC de genótipo 1 e grau de fibrose hepática F1 (*pool* F1) por tratar-se do grupo disponível, que mais se aproximava da ausência de fibrose.

A quantificação relativa de RNA no tecido hepático e na plaqueta de cada paciente foi obtida mediante a razão A/C, comparando a expressão do gene alvo

estudado no tecido ou plaqueta do paciente (A) em relação à expressão dos mesmos genes no *pool* considerado controle para a análise (C). Quando a razão A/C foi superior a 1 considerou-se maior nível de expressão; quando inferior a 1 foi considerada redução na expressão. Quando a razão A/C foi igual a 1 a expressão foi considerada igual.

Foi ainda realizada análise considerando a expressão relativa dos genes estudados na plaqueta em relação a sua expressão no tecido hepático no mesmo paciente. Utilizando para esta análise o mesmo critério acima descrito.

### **Análise Estatística**

A análise inicial dos dados consistiu em uma análise univariada utilizando o teste de qui-quadrado ou exato de Fisher para avaliar possíveis associações entre a expressão de RNAm de TGF- $\beta$ 1, PDGF-A e PDGF-B em relação aos grupos estudados. O nível de significância adotado para os testes estatísticos foi de  $p < 0,05$ .

Análises de dados mais estridentes foram realizadas, inicialmente, por análise multivariada utilizando análises de componentes principais (ACP) a partir de matriz de variância (JOHNSON; WICHERN, 2007), sendo consideradas variáveis de entrada o grau de fibrose, polimorfismo HPA-1, uso de álcool, expressão de RNAm dos fatores TGF- $\beta$ 1, PDGF-A e PDGF-B no tecido hepático e nas plaquetas.

Foi realizada, também, uma análise de correlação linear para verificar possíveis associações entre as variáveis quantitativas (expressão de RNAm de TGF- $\beta$ 1, PDGF-A e PDGF-B no tecido hepático e nas plaquetas).

Todas as análises multivariadas foram realizadas utilizando-se o software *R*, versão 3.2.0.

Para avaliar a influência do polimorfismo do sistema HPA-1 e do grau de fibrose na expressão de TGF- $\beta$ 1, PDGF-A e PDGF-B no tecido hepático e nas plaquetas foi utilizada análise de variância (ANOVA) e, o Teste *Tukey* como teste *Post Hoc*. Esta análise, também, foi realizada para avaliar as diferenças na expressão de RNAm de TGF- $\beta$ 1, PDGF-A e PDGF-B no tecido hepático e nas plaquetas nos quatro níveis de fibroses avaliados.

## RESULTADOS

Características demográficas e clínicas dos pacientes incluídos no estudo encontram-se na Tabela 1.

Tabela 1: Características demográficas e clínicas dos pacientes infectados pelo VHC incluídos no estudo.

Características	Pacientes (n = 47)
Idade, anos [mediana (IQR)]	52 (43,5 – 59,5)
Sexo, Masculino [n (%)]	31 (66,0)
Consumo abusivo de álcool [n (%)] <sup>a</sup>	20 (83,3)
Fibrose [n (%)]	
G1 (F1-F2)	23 (48,9)
G2 (F3-F4)	24 (51,0)

<sup>a</sup>Parâmetro avaliado para 24 amostras

Foi encontrada associação significativa ( $p < 0,05$ ) entre expressão de RNAm de PDGF-A no tecido hepático entre G1 e G2, sendo PDGF-A significativamente mais expresso em G2 (F3, F4) (dados não mostrados).

Quando se avaliou a expressão de RNAm dos fatores de crescimento nas plaquetas em relação ao tecido hepático em cada paciente, os resultados

demonstraram que o TGF- $\beta$ 1 e o PDGF-A encontram-se mais expressos em todos os grupos estudados. O oposto ocorre com o PDGF-B, que se apresenta menos expresso em G1 e G2 (Tabela 2).

Tabela 2: Avaliação da expressão de RNAm de TGF-  $\beta$ 1, PDGF-A e PDGF-B e nas plaquetas dos grupos G1 e G2, tendo como controle o tecido hepático correspondente.

Grupos	TGF- $\beta$ 1			PDGF-A			PDGF-B		
	Menos	Igual	Mais	Menos	Igual	Mais	Menos	Igual	Mais
G1 (n=23)	0	0	23	1	3	19	23	0	0
G2 (n=24)	1	0	23	7	3	14	22	1	1

A análise de variância (ANOVA) demonstrou que não houve diferença estatisticamente significativa do polimorfismo do sistema HPA -1 nos grupos estudados ( $p > 0,05$ ).

No entanto, a análise de variância (ANOVA) demonstrou que houve diferença estatisticamente significativa na expressão do TGF- $\beta$ 1 nas plaquetas entre os grupos estudados (Tabela 3 e 4) e, na expressão do PDGF-A no tecido hepático ( $p=0,001$ ) (Tabela 5 e 6).

Tabela 3: Análise de variância para a variável expressão do RNAm de TGF- $\beta$ 1 nas plaquetas.

Causas de variação	Graus de Liberdade	Soma dos quadrados	Quadrados médios	F calculado	p-valor
HPA1	2	0,056	0,028	0,959	0,391
Grupos	3	0,573	0,191	6,443*	0,001**
Resíduos	42	1,247	0,029		

\*F teórico=4,760, \*\*nível de probabilidade

Tabela 4: Análise de diferença entre as médias dos valores de expressão do RNAm de TGF- $\beta$ 1 nas plaquetas.

Grupos	Médias
F1	0,620 <sub>ab</sub>
F2	0,549 <sub>c</sub>
F3	0,340 <sub>ac</sub>
F4	0,402 <sub>b</sub>

Médias seguidas por mesma letra apresentam diferenças significativas (a -nível de 0,1%, b- nível de 1%, c-nível de 5%)

Tabela 5: Análise de variância para a variável Expressão do PDGF-A no tecido.

Causas de variação	Graus de Liberdade	Soma dos quadrados	Quadrados médios	F calculado	p-valor
HPA1	2	0,132	0,066	1,053	0,357
Grupos	3	1,153	0,384	6,102*	0,001**
Resíduos	42	2,646			

\*F teórico=4,760, \*\*nível de probabilidade

Tabela 6: Análise de diferença entre as médias dos valores de expressão do RNAm de PDGF-A no tecido.

Grupos	Médias
F1	0,049 <sub>a</sub>
F2	0,087 <sub>b</sub>
F3	0,150 <sub>c</sub>
F4	0,442 <sub>abc</sub>

Médias seguidas por mesma letra apresentam diferenças significativas (a, b -nível de 1%, c-nível de 5%)

Pela análise de componentes principais (ACP) foi demonstrado que as cinco primeiras componentes principais apresentaram variância cumulativa de 94%, ou seja, as cinco primeiras componentes explicam 94% da variância dos dados (Tabela 3, 4). Assim, as variáveis uso de álcool, expressão de RNAm de PDGF-B no tecido e, expressão de RNAm de TGF- $\beta$ 1 na plaqueta não se mostravam codependentes em relação as demais variáveis estudadas (Tabela 7).

Tabela 7: Desvio, variância e proporção cumulativa das componentes principais.

Variáveis	Componentes principais (CP)								
	CP <sub>1</sub>	CP <sub>2</sub>	CP <sub>3</sub>	CP <sub>4</sub>	CP <sub>5</sub>	CP <sub>6</sub>	CP <sub>7</sub>	CP <sub>8</sub>	CP <sub>9</sub>
Desvio padrão	1,9661	1,7546	1,0179	0,9559	0,6970	0,4867	0,4445	0,3400	0,1860
Proporção variância	0,3880	0,3089	0,1040	0,0917	0,0487	0,0237	0,0198	0,0116	0,0034
Proporção cumulativa	0,3880	0,6969	0,8008	0,8925	0,9413	0,9650	0,9849	0,9965	1,0000

Tabela 8: Coeficientes das 9 componentes principais<sup>1</sup>.

Variáveis	Coeficientes								
	CP <sub>1</sub>	CP <sub>2</sub>	CP <sub>3</sub>	CP <sub>4</sub>	CP <sub>5</sub>	CP <sub>6</sub>	CP <sub>7</sub>	CP <sub>8</sub>	CP <sub>9</sub>
Grau de Fibrose	0,3176	-0,2493	0,2742	-0,5915	0,5302	0,3504	-0,0764	-0,0007	0,0502
<b>Polimorfismo HPA-1</b>	-0,0376	0,0427	0,0803	-0,1559	0,3322	<b>-0,6453</b>	0,5926	0,2904	0,0515
<b>Uso de álcool</b>	0,0288	-0,0348	0,1309	-0,1743	0,0002	-0,6207	<b>-0,7486</b>	0,0131	0,0669
Expressão de PDGF-A no tecido	0,3328	-0,6713	-0,3568	0,1437	-0,1723	-0,0175	-0,0168	0,4926	0,1323
Expressão de PDGF-A na Plaqueta	-0,5179	-0,4458	0,3461	-0,3758	-0,4838	-0,0005	0,1550	-0,0832	0,0821
<b>Expressão de PDGF-B no tecido</b>	0,1138	-0,2711	-0,5186	-0,2038	0,0382	-0,2313	0,1329	<b>-0,6913</b>	-0,2286
<b>Expressão de PDGF-B na Plaqueta</b>	-0,0508	-0,0939	0,1163	-0,0041	0,0047	-0,0010	-0,0564	0,2478	<b>-0,9541</b>
Expressão de TGF-β1 no tecido	0,0665	-0,4126	0,5030	0,6171	0,2611	-0,0942	0,0390	-0,3356	-0,0076
Expressão de TGF-β1 na Plaqueta	-0,7059	-0,1805	-0,3429	0,1050	0,5244	0,1123	-0,1890	0,1171	0,0573

<sup>1</sup>Em negrito, os quatro coeficientes das componentes principais de menor importância quanto à variação total entre os dados e variáveis passíveis de descarte.

Os resultados obtidos pela análise de correlação linear estão na Tabela 9.

Tabela 9: Coeficientes de correlação simples entre as características avaliadas.

Variáveis	Coeficientes					
	Expressão de PDGF-A no tecido	Expressão de PDGF-A na Plaqueta	Expressão de PDGF-B no tecido	Expressão de PDGF-B na Plaqueta	Expressão de TGF- $\beta$ 1 no tecido	Expressão de TGF- $\beta$ 1 na Plaqueta
Expressão de PDGF-A no tecido	1					
Expressão de PDGF-A na Plaqueta	0,0866	1				
Expressão de PDGF-B no tecido	0,7317	0,2487	1			
Expressão de PDGF-B na Plaqueta	0,1065	0,6088	0,2270	1		
Expressão de TGF- $\beta$ 1 no tecido	0,2254	0,3713	0,4647	0,2692	1	
Expressão de TGF- $\beta$ 1 na Plaqueta	-0,0857	0,6483	0,1643	0,4204	0,5258	1

## DISCUSSÃO

A fibrose hepática representa um problema mundial de saúde pública, tendo como principais causas a infecção pelo vírus da hepatite C e B. Se não tratada, pode progredir para cirrose e, por fim, à falência hepática e morte (TSUKADA; PARSONS; RIPPE, 2006).

O TGF- $\beta$  e o PDGF são as principais citocinas que contribuem com a ativação e proliferação de HSCs (SEKI; SCHWABE, 2015), que representam as principais células produtoras de matriz extracelular no fígado lesionado e, quando ativadas, adquirem propriedades contráteis, pró-inflamatórias e fibrogênicas (MILANI et al., 1990; MARRA, 1999).

Tanto o TGF- $\beta$ , como PDGF já foram relacionados com a progressão da fibrose hepática (SHIRAIISHI et al., 1994; NELSON et al., 1997; KANZLER et al., 2001; ZHANG et al., 2003; DIANG et al., 2012) e diversos outros trabalhos evidenciaram um aumento nos níveis de RNAm e/ou da proteína TGF- $\beta$ 1 em modelos animais de fibrose (MILANI et al., 1991; KRULL; ZIMMERMANN; GRESSNER, 1993; KRESINA et al., 1994; KANZLER et al., 1999).

No presente estudo, de maneira geral, a expressão de TGF- $\beta$  nas plaquetas foi maior quando comparada com o tecido hepático. Embora existam diferentes fontes secretoras das citocinas pró-fibrogênicas, as plaquetas são as principais fontes de TGF- $\beta$  latente na circulação (BLAKYTNY et al., 2004).

No mesmo sentido, os resultados deste estudo mostraram que tanto o TGF- $\beta$ 1 quanto o PDGF-A estão mais expressos nas plaquetas do que no tecido hepático do mesmo paciente, independentemente do grau de fibrose, sugerindo que suas funções estejam inter-relacionadas (Tabela 2). Elevação nos níveis de RNAm do PDGF-A já foram encontrados associados ao desenvolvimento da fibrose em estudo

anterior realizado em camundongos transgênicos (THIERINGER et al., 2008). Neste mesmo estudo, a ativação das células estreladas dos animais foi associada com o aumento na expressão de TGF- $\beta$ 1 no fígado, sugerindo uma função pró-fibrogênica relevante de PDGF-A via indução de TGF- $\beta$ 1.

Além disso, a maior expressão de TGF- $\beta$ 1 nas plaquetas em pacientes com grau leve de fibrose (F1) e a maior expressão de PDGF-A no tecido hepático em pacientes com cirrose hepática (F4), corroboram a relação positiva entre estes dois fatores de crescimento. Isso poderia sugerir que na progressão da fibrose, a expressão aumentada de TGF- $\beta$ 1, aparece em uma etapa que precede o aumento da expressão de PDGF-A, propondo um mecanismo de interdependência temporal entre esses fatores.

De maneira contrária à encontrada na literatura científica, a expressão do PDGF-B apresenta-se diminuída nas plaquetas quando comparada ao tecido hepático correspondente, quando se avalia este fator de crescimento no tecido hepático.

A expressão de PDGF, no tecido hepático, está regulada positivamente após a injúria hepática (IKURA et al., 1997) e seus níveis podem estar correlacionados com o grau de dano hepático (SHIRAISHI et al., 1994). A isoforma PDGF-B tem sido considerada o mitógeno mais importante para as células estreladas (BREITKOPF et al., 2005; LAU et al., 2005; PINZANI et al., 1996; PINZANI, 2002). No fígado, foi evidenciado que a expressão de PDGF-B e seus receptores estava aumentada tanto na fibrose experimental em ratos (PINZANI et al., 1994), como em fígado humano (PINZANI et al., 1996). Em 2006, Czochra et al. demonstraram *in vivo* que a expressão aumentada de PDGF-B tinha como consequência a fibrose hepática.

Assim, os resultados obtidos por esse estudo sugerem que a ativação das HSCs está sendo mais influenciada pela expressão de PDGF-A e TGF- $\beta$  sintetizados pelo megacariócito do que pelo microambiente hepático, hipótese esta corroborada pelo fato do PDGF-B ter sido encontrado pouco expresso nas plaquetas.

Quando se consideram as vias de sinalização celular para a proliferação e ativação das HSCs, a integrina  $\alpha\beta 3$  já foi associada a este processo (PATSENKER et al., 2007). No entanto, os resultados obtidos neste estudo, evidenciaram que a expressão dos fatores TGF- $\beta 1$ , PDGF-A e PDGF-B são independentes do polimorfismo do sistema HPA -1.

Embora estudos bem estabelecidos na literatura já tenham evidenciado que a fibrose hepática é consequência da atividade pró-fibrogênica principalmente do PDGF-B sintetizado no microambiente hepático, os resultados deste estudo sugerem uma via alternativa para o desenvolvimento da fibrose mediada pelas citocinas pró-fibrogênicas PDGF-A e TGF- $\beta 1$  com origem megacariocítica e, conduzidas ao tecido hepático pelas plaquetas.

## REFERÊNCIAS

ASANO, Y. et al. Increased expression of integrin alpha(v)beta3 contributes to the establishment of autocrine TGF-beta signaling in scleroderma fibroblasts. **J. Immunol.**, v.175, n.11, p.7708–7718, dez. 2005.

BACHEM, M.G. et al. Activation of rat liver perisinusoidal lipocytes by transforming growth factors derived from myofibroblastlike cells. A potential mechanism of self perpetuation in liver fibrogenesis. **J. Clin. Investig.**, v.89, n.89, v.1, jan. 1992.

BATALLER, R.; BRENNER, D.A. Liver fibrosis. **J. Clin. Invest.**, v.115, n.2, p.209-218, fev. 2005.

BETSHOLTZ, C. Biology of platelet-derived growth factors in development. **Birth Defects Res. C. Embryo Today**, v.69, n.4, p.272-85, nov. 2003.

BLAKYTNY, R. et al. Latent TGF- $\beta$ 1 activation by platelets. **J. Cell Physiol.**, v.199, n.1, p.67-76, abr. 2004.

BREITKOPF, K. et al. Expression patterns of PDGF-A, -B, -C and -D and the PDGF-receptors alpha and beta in activated rat hepatic stellate cells (HSC). **Cytokine**, v.31, n.5, p.349–357, set. 2005.

CZOCHRA, P. et al. Liver fibrosis induced by hepatic overexpression of PDGF-B in transgenic mice. **J. Hepatol.**, v. 45, n.3, p.419-428, set. 2006.

DIANG, X.C. et al. Association between serum platelet-derived growth factor BB and degree of liver damage, fibrosis and hepatitis B e antigen (HBeAg) status in CHB patients. **Hepatogastroenterology**, v.59, n.120, p.2357-2360, nov.-dez. 2012.

FRIEDMAN, S.L. Hepatic stellate cells: protean, multifunctional, and enigmatic cells of the liver. **Physiol Rev.**, v.88, n.1, p.125-172, 2008.

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 heparan sulfate proteoglycan. **J. Biol. Chem.**, v.279, n.10, p. 8848–8855, mar. 2004.

GRAINGER, D. J. et al. Release and activation of platelet latent TGF-beta in blood clots during dissolution with plasmin. **Nat. Med.**, v.1, n.9, p.932-937, set. 1995.

GRESSNER, A.M. et al. Roles of TGF-beta in hepatic fibrosis. **Front Biosci.**, v.7, p. D793–807, abr. 2002.

HERNANDEZ-GEA,V.; FRIEDMAN, S.L. Pathogenesis of liver fibrosis. **Annu Rev. Pathol.**, v.6, p.425-456, fev. 2011.

IREDALE, J.P.; THOMPSON, A.; HENDERSON, N.C. Extracellular matrix degradation in liver fibrosis: Biochemistry and regulation. **Biochim. Biophys. Acta**, v.1832, n.7, p.876–883, jul. 2013.

JOHNSON, R.A.; WICHERN, D.W. **Applied multivariate statistical analysis**. 6rd. ed. Upper Saddle River: Prentice-Hall, 2007.

KANZLER, S. et al. Prediction of progressive liver fibrosis in hepatitis C infection by serum and tissue levels of transforming growth factor- $\beta$ . **J. Viral Hepat.**, v.8, n.6, p.430-437, nov. 2001.

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.

KRESINA, T.F. et al. Gene expression of transforming growth factor beta 1 and extracellular matrix proteins in murine *Schistosoma mansoni* infection. **Gastroenterology**, v.107, n.3, p.773-780, set. 1994.

KRULL, N.B.; ZIMMERMANN, T.; GRESSNER, A.M. Spatial and temporal patterns of gene expression for the proteoglycans biglycan and decorin and for transforming growth factor-beta 1 revealed by in situ hybridization during experimentally induced liver fibrosis in the rat. **Hepatology**, v.18, n.3, p.581-589, set. 1993.

LAU, D.T. et al. Intrahepatic gene expression profiles and alpha-smooth muscle actin patterns in hepatitis C virus induced fibrosis. **Hepatology**, v.42, n.2, p.273-281, ago. 2005.

LOTERSZTAJN, S. et al. Hepatic fibrosis: molecular mechanisms and drug targets. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.**, v.45, p.605-628, 2005.

MARRA, F. Hepatic stellate cells and the regulation of liver inflammation. **J. Hepatol.**, v.31, n.6, p.1120–1130, dez. 1990.

MILANI, S. et al. Transforming growth factors beta 1 and beta 2 are differentially expressed in fibrotic liver disease. **Am. J. Pathol.**, v.139, n.6, p.1221-1229, dez. 1991.

MILANI, S. et al. Procollagen expression by nonparenchymal rat liver cells in experimental biliary fibrosis. **Gastroenterology**, v.98, n.1, p.175–184, jan. 1990.

MU, D. et al. The integrin alpha(v)beta8 mediates epithelial homeostasis through MT1-MMP-dependent activation of TGF-beta1. **J. Cell Biol.**, v.157, n.3, p.493–507, abr. 2002.

MUNGER, J.S. et al. The integrin  $\alpha\beta 6$  binds and activates latent TGF $\beta 1$ : a mechanism for regulating pulmonary inflammation and fibrosis. **Cell**, v.96, n.3, p.319-28, fev. 1999.

NELSON, D.R. et al. Transforming growth factor-beta 1 in chronic hepatitis C. **J. Viral Hepat.**, v.4, n.1, p.29-35, jan. 1997.

PADOVANI, J.L. et al. In vitro detection of hepatitis C virus in platelets from uninfected individuals exposed to the virus. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v.46, n.2, p.154-5, mar. 2013.

PARSONS, C.J.; TAKASHIMA, M.; RIPPE, R.A. Molecular mechanisms of hepatic fibrogenesis. **J. Gastroenterol. Hepatol.**, v.22, p.S79-84, jun. 2007.

PATSENKER, E. et al. Pharmacological inhibition of the vitronectin receptor abrogates PDGFBB-induced hepatic stellate cell migration and activation in vitro. **J. Hepatol.**, v.46, n.5, p.878–887, maio 2007.

PINZANI, M. et al. Expression of platelet-derived growth factor and its receptors in normal human liver and during active hepatic fibrogenesis. **Am. J. Pathol.**, v.148, n.3, p.785–800, mar. 1996.

PINZANI, M. et al. Expression of platelet-derived growth factor in a model of acute liver injury. **Hepatology**, v.19, n.3, p.701-707, mar. 1994.

PINZANI, M. PDGF and signal transduction in hepatic stellate cells. **Front Biosci.**, v.7, p. d1720–1726, ago. 2002.

POYNARD, T.; BEDOSSA, P.; OPOLON, P. Natural history of liver fibrosis progression in patients with chronic hepatitis C. **Lancet**, v.349, n.9055, p.825-832, 1997.

RACINE-SAMSON, L.; ROCKEY, D.C.; BISSELL, D.M. The role of alpha1beta1 integrin in wound contraction. A quantitative analysis of liver myofibroblasts in vivo and in primary culture. **J. Biol. Chem.**, v.272, n.49, p.30911–30917, dez. 1997.

SEKI, E., SCHWABE, R.F. Hepatic Inflammation and Fibrosis: Functional Links and Key Pathways. **Hepatology**, v.61, n. 3, p. 1066–79 mar, 2015.

SHIRAISHI, T. et al. Increased release of platelet-derived growth factor from platelets in chronic liver disease. **Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem.**, v.32, n.1, p.5–9, jan. 1994.

SILVA, G.F. et al. Human Platelet Antigen (HPA) genotype is associated with fibrosis progression in Chronic Hepatitis C. **J. Med. Virol.**, v.84, n.1, p.56-60, jan. 2012.

THIERINGER et al. Spontaneous hepatic fibrosis in transgenic mice overexpressing PDGF-A. **Gene**, v.423, n.1, p.23-28, out. 2008.

TSUKADA, S.; PARSONS, C.J.; RIPPE, R.A. Mechanisms of liver fibrosis. **Clin. Chim. Acta.**, v.364, n.1-2, p.33-60, fev. 2006.

VERDICHIO-MORAES, C.F. et al. Allelic frequencies of HPA-1 to 5 human platelet antigens in patients infected with hepatitis C virus. **J. Med. Virol.**, v.81, n.4, p.757-759, abr. 2009.

WIPFF, P.J. et al. Myofibroblast contraction activates latent TGF-beta1 from the extracellular matrix. **J. Cell Biol.**, v.179, n.6, p.1311–1323, dez. 2007.

ZHANG, Y. et al. Involvement of integrinlinked kinase in carbon tetrachloride-induced hepatic fibrosis in rats. **Hepatology**, v.44, n.3, p.612-622, set. 2006.

ZHOU, X. et al. Engagement of alphavbeta3 integrin regulates proliferation and apoptosis of hepatic stellate cells. **J. Biol. Chem.**, v.279, n.23, p.23996–24006, jun. 2004.

### *Capítulo III*

---

*Artigo aceito para publicação*

**Artigo aceito para publicação na Revista da Sociedade  
Brasileira de Medicina Tropical**

**Title:** Absence of HPA polymorphism effect on progression of fibrosis in HIV-1/HCV-coinfected patients

**Running title:** HPA Polymorphism in Coinfected Patients

**Author's name:** Natália Picelli<sup>1</sup>, Aline Aki Tanikawa<sup>1</sup>, Rejane Maria Tommasini Grotto<sup>1,2</sup>, Giovanni Faria Silva<sup>3</sup>, Alexandre Naime Barbosa<sup>4</sup>, Adriana Camargo Ferrasi<sup>1</sup>, Liciana Vaz de Arruda Silveira<sup>5</sup>, Maria Inês de Moura Campos Pardini<sup>1,3</sup>

**Affiliations:**

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

<sup>2</sup>Department of Bioprocess and Biotechnology, School of Agricultural Sciences, Lageado Experiment Station, UNESP - Sao Paulo State University, Botucatu, Sao Paulo, Brazil

<sup>3</sup>Department of Internal Medicine, Botucatu Medical School, UNESP - São Paulo State University, Botucatu, Sao Paulo, Brazil

<sup>4</sup>Department of Tropical Diseases, Botucatu Medical School, UNESP - São Paulo State University, Botucatu, Sao Paulo, Brazil

<sup>5</sup>Department of Biostatistics, Institute of Bioscience, UNESP – São Paulo State University, Botucatu, Sao Paulo, Brazil

Correspondence to: Maria Inês de Moura Campos Pardini, Laboratório de Biologia Molecular do Hemocentro, Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP, Distrito de Rubião Jr, s/ n°, 18618-970, Botucatu – SP, Brazil. E-mail: inespardini@gmail.com; Phone/Fax: +55 (14) 38116041

**Title:** The absence of the human platelet antigen polymorphism effect on fibrosis progression in human immunodeficiency virus-1/hepatitis C virus coinfecting patients

**Running title:** HPA Polymorphism in Coinfecting Patients

**Introduction:** The progression of hepatic fibrosis in chronic infection with hepatitis C virus (HCV) has been related to viral and host factors, such as genetic polymorphisms. It has been demonstrated that polymorphisms of human platelet antigens (HPA), which reside on integrins present on platelets and liver stellate cells, are associated with the rapid development of fibrosis in monoinfected HCV patients. However, it is not known if such association exists in HIV-1/HCV-coinfected patients.

**Methods:** Genomic DNA of 36 HIV-1/HCV-coinfected patients was used for genotyping by PCR-SSP to analysis of HPA-1 and -3, or PCR-RFLP to analysis of HPA-5 polymorphism. The progression of fibrosis was evaluated utilizing the METAVIR score, where two groups were formed: G1 (n=23, with F1, portal fibrosis without septa or F2, few septa) and G2 (n=13, with F3, numerous septa or F4, cirrhosis). Fisher's exact test was utilized to determine possible associations between the HPA -1, -3 and -5 polymorphisms and progression to fibrosis. **Results:** There was no deviation from *Hardy-Weinberg* equilibrium in all HPA systems evaluated. Statistically significant differences were not observed in the distribution of allelic and genotypic frequencies of the HPA systems between G1 and G2. **Conclusion:** These data suggest that the greater stimulation of hepatic stellate cells by the presence of HIV and, consequently, the increased expression of TGF- $\beta$  can offset the effect of HPA polymorphism in the progression of fibrosis in HIV-1/HCV-coinfected patients.

**Keywords:** Coinfection; Hepatitis C virus; Human Immunodeficiency Virus; Human Platelet Antigen; Liver Fibrosis.

## INTRODUCTION

The progression of hepatic fibrosis in patients with chronic hepatitis C virus (HCV) infection is dependent on different viral and host factors. Sex, age at infection, consumption of alcohol, coinfection with human immunodeficiency virus (HIV) and hepatitis B virus have been associated with liver fibrosis progression.<sup>(1) (2) (3)</sup>. Similarly, host genetic factors have also been related to this progression. Besides human leukocyte antigen (HLA), other genetic polymorphisms such as in the genes of interleukin 10 (IL-10), tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ), angiotensinogen and transforming growth factor  $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1) have been associated with progression of fibrosis in patients monoinfected with HCV<sup>(4)</sup>.

Along the same line, the expression of some integrins, present in various cell types including platelets<sup>(5)</sup> and liver stellate cells<sup>(6) (7)</sup>, have also been related to the development of fibrosis<sup>(8) (9)</sup>.

The integrins present on the platelet membrane express various types of antigens on their surface, among which the human platelet antigens (HPA) have received considerable attention<sup>(10)</sup>.

HPA are polymorphic in the population, and polymorphism in most of these antigens is due to the substitution of a single amino acid in the protein, as a consequence of the substitution of one nucleotide in DNA<sup>(11) (12)</sup>. The polymorphisms of some HPA systems have been associated with diseases involving platelets<sup>(13)</sup> and also to disorders that do not involve platelet disturbances such as sickle cell anemia<sup>(14)</sup>, myocardial infarction<sup>(15)</sup>, and venous thrombosis<sup>(16)</sup>. In the last years, HPA polymorphism has also been associated with viral infections such as infection with dengue virus<sup>(17)</sup>, HCV mono-infection<sup>(18)</sup> and HIV/HCV coinfection (Grotto et al.: in press).

In addition, a recent study demonstrated an association of the HPA -1a/1b genotype with the rapid development of fibrosis in patients monoinfected with HCV<sup>(19)</sup>. However, it's unknown if there is an association between HPA polymorphism and progression of fibrosis in HIV/HCV-coinfected patients.

Thus, the aim of this study was to determine the possible associations of the polymorphic systems HPA-1, -3 and -5 [HPA-4b allele is rare in Brazil]<sup>(20)</sup>, in the progression of hepatic fibrosis in individuals coinfecting with HIV-1 and HCV.

## **METHODS**

### Patients

Samples of EDTA-anticoagulated peripheral venous blood were collected from 36 HIV-1/HCV-coinfected patients seen at the SAE of Infectologia “Domingos Alves Meira” – FAMESP and at the Department of Internal Medicine, Gastroenterology Division, Botucatu School of Medicine, Sao Paulo State University, UNESP, Botucatu, SP, Brazil. Inclusion criteria were the presence of HIV-1/HCV coinfection (using RT-PCR), liver biopsy performed before the start of antiviral treatment, the absence of other hepatic diseases and signed informed consent.

The patients were divided into two groups according to degree of fibrosis determined in liver biopsies, which were performed using the Menghini or Tru-Cut needle. The fragments were analyzed when at least eight portal spaces were present. The tissue was submitted to hematoxylin–eosin, Masson trichrome, and reticulin staining. The biopsies were analyzed by a pathologist, using the METAVIR scoring system<sup>(21)</sup>. The groups were Group 1 (G1): HIV-1/HCV-coinfected patients with lower stage of fibrosis (F1, portal fibrosis without septa or F2, few septa) and Group 2 (G2): HIV-1/HCV-coinfected patients with higher degree of fibrosis (F3, numerous septa or F4,

cirrhosis). The study included patients infected with HCV genotype 1, 2 or 3, and HIV subtype B, F or BF recombinant. From the databank, information was obtained regarding sex, age, time of infection, defined as the time elapsed between the presumed date of infection and the date of biopsy (information evaluated in 27 of the 36 patients), and information on alcohol abuse, defined as more than 40 g per day for females and over 80 g per day for males (information evaluated in 29 of the 36 patients studied).

#### DNA extraction and HPA genotyping

Genomic DNA was isolated from whole blood using a commercial Axy Prep Blood Genomic DNA Miniprep Kit (Axygen Scientific, Inc, Union City, CA, USA). HPA-1 and -3 were genotyped by PCR sequence-specific primers according to Kluter et al.<sup>(22)</sup>, using the C-reactive protein gene (CRP) as the internal positive control in all reactions. HPA -5 was genotyped by PCR-restriction fragment length polymorphism according to Kalb et al.<sup>(23)</sup>. A negative control was performed in all PCR assays.

#### Statistical analysis

The Hardy–Weinberg equilibrium test was carried out to evaluate the distribution of the allelic frequencies of HPA-1, -3 and -5 according to degree of fibrosis. Fisher's exact test was used to investigate possible associations between HPA alleles, genotypes and degree of fibrosis in HIV-1/HCV-coinfected patients. The level of significance for all statistical tests was set at 0.05.

## Ethics

The study was approved by the Research Ethics Committee of Botucatu Medical School, UNESP (3750-2010).

## RESULTS

Table 1 shows the demographic characteristics of the group studied.

There was no deviation from *Hardy–Weinberg* equilibrium in the HPA systems evaluated. Statistically significant differences were not observed in relation to the distribution of allelic and genotypic frequencies of HPA systems between G1 and G2 (Table 2).

## DISCUSSION

The progression of hepatic fibrosis in infection with hepatitis C virus has been associated with factors such as sex, alcohol consumption, age at infection<sup>(1) (2) (3)</sup> and genetic factors<sup>(4)</sup>.

The development of fibrosis occurs mainly by the activity of liver stellate cells<sup>(24) (25)</sup> and the activation of these cells has been related to regulation by proteins of the family of integrins<sup>(8) (9)</sup>, some of which are expressed on hepatic stellate cells<sup>(6) (7)</sup>.

In 2012, Silva and coworkers<sup>(19)</sup> found in patients monoinfected with HCV, the association of the genotype HPA-1a/1b with more rapid progression of fibrosis, reaching F3/F4 earlier. However, this was not observed among the HIV-1/HCV-coinfected patients in the present study, suggesting that the effect of HPA polymorphism on progression of hepatic fibrosis observed in HCV monoinfected patients appears to be lost with the presence of HIV.

Unlike HCV, HIV does not replicate in human hepatocytes. However, the coreceptors CCR5 and CXCR4, which allow the entrance of HIV into its target cells, are expressed on hepatocytes and stellate cells. It has been demonstrated that the interaction of HIV with these cells via CCR5 and CXCR4, leads to the activation of cell signaling<sup>(26) (27) (28)</sup> and, consequently, to a greater expression of pro-fibrogenic factors, such as TGF- $\beta$ 1, involved in the activation of stellate cells.

Thus, the presence of HIV-1 and the activation of signaling pathways via non-integrin receptors, may lead to a greater stimulation of stellate cells, as a result of increased expression of TGF- $\beta$ , offsetting the effect of the HPA polymorphism on progression of hepatic fibrosis.

#### **CONFLICT OF INTEREST**

The authors declare that there is no conflict of interest.

## REFERENCES

1. Poynard T, Ratziu V, Charlotte F, Goodman Z, McHutchison J, Albrecht J. Rates and risk factors of liver fibrosis progression in patients with chronic hepatitis C. *J Hepatol* 2001; 34:730-739.
2. Deuffic S, Buffat L, Poynard T, Valleron AJ. Modeling the hepatitis C virus epidemic in France. *Hepatology* 1999; 29:1596-1601.
3. Seef LB. Natural history of chronic hepatitis C. *Hepatology* 2002;36:35-46.
4. Powell EE, Edwards-Smith CJ, Hay JL, Clouston AD, Crawford DH, Shorthouse C et al. Host genetic factors influence disease progression in chronic hepatitis C. *Hepatology* 2000; 31:828-833.
5. Takada Y, Simon S. Protein family review: The integrins. *Genome Biol* 2007; 8:215-219.
6. Racine-Samson L, Rockey DC, Bissell DM. The role of  $\alpha1\beta1$  integrin in wound contraction. A quantitative analysis of liver myofibroblasts in vivo and in primary culture. *J Biol Chem* 1997; 272:30911-30917.
7. Gao R, Brigstock DR. 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* 2004; 279:8848-8855.
8. Nejari M, Couvelard A, Mosnier JF, Moreau A, Feldmann G, Degott C et al. Integrin up-regulation in chronic liver disease: Relationship with inflammation and fibrosis in chronic hepatitis C. *J Pathol* 2001; 195:473-481.

9. Popov Y, Patsenker E, Stickel F, Zaks J, Bhaskar KR, Niedobitek G et al. Integrin  $\alpha\text{v}\beta 6$  is a marker of the progression of biliary and portal liver fibrosis and a novel target for antifibrotic therapies. *J Hepatol* 2008; 48:453-648.
10. Schroeder ML, Rayner HL. Red cell, platelet and white cell antigens. In: Lee GR, Bithell TC, Foerster J, Athens JW, Lukens JN. *Wintrobe's Clinical Hematol.* 9<sup>th</sup> ed. Philadelphia (PA): Lea & Febiger; 1993. p. 616-50.
11. Lucas GF, Metcalfe P. Platelet and granulocyte polymorphisms. *Transfus Med* 2000; 10:157-174.
12. Metcalfe P, Watkins NA, Ouwehand WH, Kaplan C, Newman P, Kekomaki R et al. Nomenclature of human platelet antigens. *Vox Sang* 2003; 85:240-245.
13. Muller-Eckhardt C, Kiefel V, Santoso S. Review and update of platelet alloantigen systems. *Transfus Med Rev* 1999; 4:98.
14. Castro V, Alberto FL, Costa RN, Lepikson-Neto J, Gualandro SF, Figueiredo MS 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.* 2004; 87:118-123.
15. Rosenberg N, Zivelin A, Chetrit A, Dardik R, Kornbrot N, Freimark D et al. Effects of platelet membrane glycoprotein polymorphisms on the risk of myocardial infarction in young males. *Isr Med Assoc J* 2002; 4:411-414.
16. Ridker PM, Hennekens CH, Schmitz C, Stampfer MJ, Lindpaintner K. PIA1/A2 polymorphism of platelet glycoprotein IIIa and risks of myocardial infarction, stroke and venous thrombosis. *Lancet* 1997; 349:385–388.
17. Soundravally R, Hoti SL. Immunopathogenesis of dengue hemorrhagic fever and shock syndrome: Role of TAP and HPA gene polymorphism. *Hum Immunol* 2007; 68:973-979.

18. Verdichio-Moraes CF, Toralles-Pereira C, Grotto RMT, Silva GF, Pardini MIMC. Allelic frequencies of HPA-1 to -5 human platelet antigens in hepatitis C virus-infected patients. *J Med Virol* 2009; 81:757-759.
19. Silva GF, Grotto RM, Verdichio-Moraes CF, Corvino SM, Ferrasi AC, Silveira LV et al. Human Platelet Antigen (HPA) genotype is associated with fibrosis progression in chronic hepatitis C. *J Med Virol* 2012; 84:56-60.
20. Toralles-Pereira C, Pardini MIMC, Deffune E, Machado PEA. The first report of the allele HPA-4b in a Brazilian. *Int J Immunogenet* 2005; 32:165-166.
21. Poynard T, Bedossa P, Opolon P. For the OBSVIRC, METAVIR, CLINIVIR, and DOSVIRC groups. Natural history of liver fibrosis progression in patients with chronic hepatitis C. *Lancet* 1997; 349:825-832.
22. Kluter H, Fehlau K, Panzer S, Kirchner H, Bein G. Rapid typing for human platelet antigen systems -1, -2, -3 and -5 by PCR amplification with sequence-specific primers. *Vox Sang* 1996; 71:121-125.
23. Kalb R, Santoso S, Unkelbach K, Kiefel V, Mueller-Eckhardt C. Localization of the Br polymorphism on a 144bp exon of the GPIa gene and its application for platelet DNA typing. *Thromb Haemost* 1994; 71:651-654.
24. Gabele E, Brenner DA, Rippe RA. Liver fibrosis: signals leading to the amplification of the fibrogenic hepatic stellate cell. *Front Biosci* 2003; 8:69-77.
25. Friedman SL. Liver fibrosis – from bench to bedside. *J Hepatol* 2003; 38:38-53.
26. Lin W, Weinberg EM, Tai AW, Peng LF, Brockman MA, Kim KA et al. HIV increases HCV replication in a TGF- $\beta$ 1-dependent manner. *Gastroenterology* 2008; 134:803–811.
27. Bruno R, Galastri S, Sacchi P, Cima S, Caligiuri A, DeFranco R et al. gp120 modulates the biology of human hepatic stellate cells: a link between HIV infection and liver fibrogenesis. *Gut* 2010; 59:612-622.

28. Tuyama AC, Hong F, Saiman Y, Ozkok D, Mosoian A et al. Human immunodeficiency virus (HIV)-1 infects human hepatic stellate cells and promotes collagen I and monocyte chemoattractant protein-1 expression: implications for the pathogenesis of HIV/hepatitis C virus-induced liver fibrosis. *Hepatology* 2010; 52:612–622.

**Table 1:** Demographic characteristics of HCV/HIV-coinfected patients included in the study (n=36).

Characteristic	HIV/HCV coinfecting patients (n = 36)
Age, years [median (IQR)]	44.19 (38.75-49.25)
Gender, Male [n (%)]	26 (72.22)
Time of infection, years (mean) <sup>a</sup>	13.4
Abusive alcohol consumption [n (%)] <sup>b</sup>	10 (27.8)
Fibrosis [n (%)]	
G1 (F1-F2)	23 (63.89)
G2 (F3-F4)	13 (36.11)

HCV: Hepatitis C virus; HIV: Human immunodeficiency virus; IQR: Interquartile range; G1: Group 1; G2: Group 2.  
<sup>a</sup> Parameter evaluated for 27 samples; <sup>b</sup> Parameter evaluated for 29 samples

**Table 2:** Allelic and genotypic frequency of HPA-1, -3 and -5 in HCV/HIV coinfecting patients in groups G1 (F1 and F2) and G2 (F3 and F4).

	G1 (n=23)	G2 (n=13)	P-value
Allele <sup>a</sup>			
1a	36	22	
1b	10	4	0.5129
3a	28	20	
3b	18	6	0.1652
5a	42	25	
5b	4	1	0.4369
Genotype <sup>a</sup>			
1a/1a	14	10	
1a/1b	8	2	0.4296
1b/1b	1	1	
3a/3a	8	8	
3a/3b	12	4	0.4262
3b/3b	3	1	
5a/5a	19	12	
5a/5b	4	1	0.6336
5b/5b	0	0	

<sup>a</sup> Analysis using Fisher's exact test.

## *Capítulo IV*

---

*Artigo publicado durante o período de Doutorado*

**Artigo publicado na Revista de Saúde Pública**

**DOI: 10.1590/S0034-8910.2013047004701**

Aline Aki Tanikawa<sup>I,IV</sup>

Sarita Fiorelli Dias Barreto<sup>II,IV</sup>

Rejane Maria Tommasini  
Grotto<sup>III,IV</sup>

Maria Inês de Moura Campos  
Pardini<sup>III,IV</sup>

## Coexistence of HIV-1 variants with dipeptidic insertion in the reverse transcriptase gene

### ABSTRACT

The aim of this communication was to describe the detection of the coexistence of HIV-1 variant with dipeptide insertion between codons 69 and 70 of reverse transcriptase. These variants were isolated from a 16-year-old male patient, undergoing treatment in the city of Marília, SP, Southeastern Brazil. After confirmation of treatment failure, resistance to antiretroviral drugs testing was performed and two variants with the insertions of the aminoacids Ser-Gly/Ser-Ala at codon 69 of reverse transcriptase were detected, besides the T69S mutation. These insertions have low prevalence, have not been reported in situations of coexistence in Brazil and are related to multidrug resistance, which makes this epidemiological finding relevant.

**DESCRIPTORS:** HIV-1, genetics. HIV Reverse Transcriptase. Human Immunodeficiency Virus Proteins. Drug Resistance, Multiple, Viral.

<sup>I</sup> Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia em Clínica Médica. Faculdade de Medicina de Botucatu. Universidade Estadual Paulista. Botucatu, SP, Brasil

<sup>II</sup> Programa de Pós-Graduação em Pesquisa e Desenvolvimento: Biotecnologia Médica. Faculdade de Medicina de Botucatu. Universidade Estadual Paulista. Botucatu, SP, Brasil

<sup>III</sup> Departamento de Clínica Médica. Faculdade de Medicina de Botucatu. Universidade Estadual Paulista. Botucatu, SP, Brasil

<sup>IV</sup> Laboratório de Biologia Molecular. Faculdade de Medicina de Botucatu. Universidade Estadual Paulista. Botucatu, SP, Brasil

#### Correspondence:

Maria Inês de Moura Campos Pardini  
Faculdade de Medicina de Botucatu  
Laboratório de Biologia Molecular – Divisão  
Hemocentro  
Distrito de Rubião Júnior, s/ nº  
18618-970 Botucatu, SP, Brasil  
E-mail: inespardini@gmail.com

Received: 12/18/2012

Approved: 4/25/2013

Article available from: [www.scielo.br/rsp](http://www.scielo.br/rsp)

## INTRODUCTION

The selective pressure of the antiretroviral therapy (ARV) scheme may result in the emergence of resistant variants, which pre-exist in a minority of HIV infected patients. Point mutation of one or two bases in the reverse transcriptase (RT) gene are linked to resistance to inhibitors of this enzyme. Moreover, there are reports that resistance to multiple nucleoside analogs can also be the result of several insertions/mutations present in the viruses.<sup>1,5</sup>

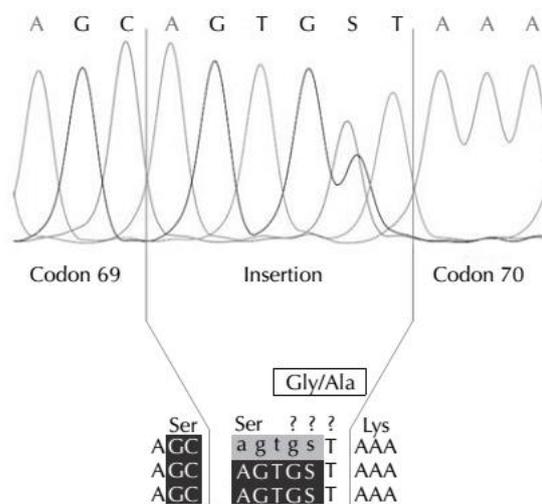
Prolonged use of ARV therapy with zidovudine, often together or followed by administration of other nucleoside inhibitors, is linked with the selection of variants with amino acid insertion between residues 69 and 70 of HIV-1 RT.<sup>3,5</sup>

The aim of this study was to describe the detection of coexisting HIV-1 variants with insertions of two amino acids between codons 69 and 70 of RT.

## DESCRIPTION OF THE CASE

The patient was male, aged 16, dark skinned and with vertical exposure to HIV. The case was reported in 1996 and, since then, the viral load remained detectable and CD4+ levels low without, however, developing symptoms of Acquired Immune Deficiency Syndrome (AIDS). The lowest CD4+ lymphocyte count occurred in 2011, 234 cells/mm<sup>3</sup>, and the viral load in that same year was 4.624 log. The administration of ARV drugs started in 2007 with the RT inhibitors zidovudine and didanosine, followed by the introduction of efavirenz in 2008. After the patient committed himself to adhering to treatment, antiretroviral resistance testing (TRUGENE<sup>®</sup> HIV-1 Genotyping Test on an OpenGene<sup>®</sup> DNA Sequencing System, Siemens Healthcare Diagnostics, Deerfield, IL, USA) was requested in 2011 and carried out in the Molecular Biology Laboratory of the Blood Transfusion Center at the Botucatu Medical School, *Universidade Estadual Paulista (UNESP)*, part of the Ministry of Health Brazilian Network for HIV-1 Genotyping (RENAGENO).

The viral subtype F1 was characterized using the reverse transcriptase gene, according to analysis with the REGA HIV Subtyping tool.<sup>a</sup> The sequence obtained showed T69S mutation, following insertions of Ser-Gly (SG) / Ser-Ala (SA), which suggests the coexistence of viral variants with different amino acid insertions at codon 69, confirmed from sequences generated by forward and reverse primers, according to the specifications of the technique used. Analysis of



**Figure.** Part of the electropherogram of a genomic sequence of the HIV-1 reverse transcriptase region, demonstrating the insertion of two amino acids (Ser and Gly/Ala) between codons 69 and 70, which was confirmed based on sequences generated by forward and reverse primers, according to the specifications of the technique used (TRUGENE<sup>®</sup> hiv-1 Genotyping Test on OpenGene<sup>®</sup> DNA Sequencing System, Siemens Healthcare Diagnostics, Deerfield, IL, EUA).

the electropherogram (Figure) showed the nucleotide sequences AGT and GST simultaneously.

The profile of mutation included A62V, K101P/Q, K103N, V106I, V179D/E, Y188L, T215Y mutations in the reverse transcriptase gene, as well as L10I and M36I mutations in the protease. No resistance to protease inhibitors was observed. In contrast, there was resistance to a variety of RT inhibitor drugs.

The sequence obtained was analyzed using the Blast Basic Local Alignment Search Tool (Blast) algorithm,<sup>b</sup> available from the National Center for Biotechnology Information (NCBI), with a similarity of 93%.

## DISCUSSION

The insertion of two amino acids alone between residues 69 and 70 of HIV-1 RT does not confer significant resistance. However, when combined with substitutions, such as T215Y, M41L, A62V or L210W, it can lead to the emergence of resistant variants to multiple nucleoside analogs.<sup>1,3,5</sup>

Insertion mutations between codons 69 and 70 are present, with a low prevalence (approximately 0.5% to 2.4%),<sup>2,3,4</sup> in nucleoside analog reverse transcriptase inhibitors-experienced individuals, the most common being insertion of serine-serine, serine-arginine and

<sup>a</sup> REGA HIV Subtyping Tool [cited 2012 Nov 19]. Available from: <http://www.bioafrica.net/rega-genotype/html/subtypinghiv.html>

<sup>b</sup> National Center for Biotechnology Information (NCBI). Basic Local Alignment Search Tool (BLAST); 2012 [ cited 2012 Nov 20]. Available from: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

serine-glycine. Such rearrangements are located in the structure of the  $\beta$ 3- $\beta$ 4 hairpin loop of HIV-1 RT and are susceptible to interaction with the nucleotide binding process.<sup>2</sup>

In 1999, Larder et al<sup>1</sup> reported that the 69Ser-(Ser-Ser) mutation, by itself, only showed significant decrease in susceptibility to 3TC. However, Winters et al<sup>5</sup> (1998) reported that the 69Ser-(Ser-Ala) or 69Ser-(Ser-Gly) mutation, even without other genotypic mutations, would confer resistance to multiple drugs.

Detection of the single substitution, Thr69Ser, suggests that the mutation may develop before insertion of the amino acid. However, the specific mechanism required for the occurrence of the insertion is not known.<sup>1</sup>

In Brazil, there are no reports which show the presence of HIV-1 variants with insertion of dipeptides between codons 69 and 70 of the RT in coexistence, which makes the finding relevant from an epidemiological point of view, since such insertion is related to resistance to multiple nucleoside analogs and little is known about its prevalence or clinical significance.

## REFERENCES

1. Larder BA, Bloor S, Kemp SD, Kurt H, Desmet RL, Miller V, et al. A family of insertion mutations between codons 67 and 70 of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase confer multinucleoside analog resistance. *Antimicrob Agents Chemother.* 1999;43(8):1961-7.
2. Masquelier B, Race E, Tamalet C, Descamps D, Izopet J, Buffet-Janvresse C, et al. Genotypic and phenotypic resistance patterns of human immunodeficiency virus type 1 variants with insertions or deletions in the reverse transcriptase (RT): multicenter study of patients treated with RT inhibitors. *Antimicrob Agents Chemother.* 2001;45(6):1836-42. DOI:10.1128/AAC.45.6.1836-1842.2001
3. Tamalet C, Yahi N, Tourrès C, Colson P, Quinson AM, Poizot-Martin I, et al. Multidrug resistance genotypes (insertions in the  $\beta$ 3- $\beta$ 4 finger subdomain and MDR Mutations) of HIV-1 reverse transcriptase from extensively treated patients: incidence and association with other resistance mutations. *Virology.* 2000;270(2):310-6. DOI:10.1006/viro.2000.0261
4. Van Vaerenbergh K, Van Laethem K, Albert J, Boucher CA, Clotet B, Floridia M, et al. Prevalence and characteristics of multinucleoside-resistant human immunodeficiency virus type 1 among European patients receiving combinations of nucleoside analogues. *Antimicrob Agents Chemother.* 2000;44(8):2109-17. DOI:10.1128/AAC.44.8.2109-2117.2000
5. Winters MA, Coolley KL, Girard YA, Levee DJ, Hamdan H, Shafer RW, et al. A 6-basepair insert in the reverse transcriptase gene of human immunodeficiency virus type 1 confers resistance to multiple nucleoside inhibitors. *J Clin Invest.* 1998;102(10):1769-75. DOI:10.1172/JCI4948

---

The authors declare that there are no conflicts of interests.

## *Capítulo V*

---

*Artigo em fase de elaboração*

**Análise comparativa dos algoritmos de interpretação para  
o teste de genotipagem do HIV-1**

## RESUMO

A emergência de variantes resistentes representa um dos principais obstáculos para o sucesso terapêutico na infecção pelo HIV-1. Os algoritmos de interpretação do teste de resistência genotípica permitem a inferência indireta sobre sensibilidade ou resistência aos antirretrovirais (ARVs) utilizados. No entanto, divergências na interpretação do teste, devido à utilização de diferentes algoritmos, podem dificultar a conduta clínica. Assim, o objetivo do estudo foi comparar os resultados obtidos no teste de genotipagem para as regiões codificadoras da transcriptase reversa e protease do HIV, entre o algoritmo HIVdb (*Stanford University Genotypic Resistance Interpretation Algorithm*) e Algoritmo Brasileiro (Brasil, Ministério da Saúde). Trezentos e oitenta sequências obtidas a partir de vírus circulantes em pacientes atendidos pelo Laboratório de Biologia Molecular, do Hemocentro de Botucatu, UNESP, ponto executor da RENAGENO, foram analisadas utilizando os algoritmos propostos. Os dados obtidos foram divididos em resistente, susceptível e intermediário, e comparados utilizando testes estatísticos. Os resultados demonstraram que os dois algoritmos não são totalmente concordantes e, os ARVs ddl, TDF e FPV/R, apresentaram os menores níveis de concordância quando comparados às demais drogas de suas classes. Sabendo-se que polimorfismos regionais do HIV-1 podem interferir na interpretação do exame, acreditamos que as barreiras genéticas das populações virais sejam o motivo das discordâncias observadas entre os algoritmos analisados, pois cada população possui um perfil genético diferente.





**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. 573/10-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 3751-2010**) Avaliação dos fatores de crescimento TGF beta 1 e PDGF na progressão das fibrose hepática em pacientes cronicamente infectados pelo vírus da hepatite C, a ser conduzido por Aline Aki Tanikawa, orientada por Vossa Senhoria, com a participação dos Drs. Giovanni Faria Silva, Kunie Iabuki Rabello Coelho e Rejane Maria Tommasini Grotto, recebeu do relator parecer favorável aprovado em reunião de 06 de dezembro de 2.010.

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

Atenciosamente,

Alberto Santos Capelluppi  
Secretário do CEP