



9º Simposio de Ensino de Graduação

AVALIAÇÃO DO PAPEL DO ANTÍGENO PLAQUETÁRIO HUMANO 2 (HPA-2) EM PLAQUETAS EXPOSTAS AO VÍRUS DA HEPATITE C (HCV) IN VITRO

Autor(es)

JULIANA RODRIGUES MACHADO

Orientador(es)

JOSÉ EDUARDO DA FONSECA

1. Introdução

A Hepatite C é uma doença hepática provocada pelo vírus da hepatite C. Sua denominação original, em língua inglesa, é Hepatitis C Virus (HCV), conforme registram os autores Koff e Dienstag (1995). Há muito tempo a doença se configura como um problema de saúde pública devido ao grande número de pessoas infectadas no mundo e a seu grande potencial de evolução para cirrose e hepatocarcinoma (STRAUSS, 2001). A infecção aguda pelo HCV geralmente se apresenta assintomática (FERREIRA & SILVEIRA, 2004). No entanto, a maioria dos casos evolui para a cronicidade sendo que de 75 a 85% dos portadores crônicos evoluem para formas leves da doença, enquanto de 15% a 25% para formas moderadas e graves (BEP, 2005). O HCV é um vírus RNA envelopado, da família Flaviviridae, com genoma em fita simples de polaridade positiva, com 9,7 kilobases, flanqueado por duas regiões não traduzidas (3' e 5' – untranslated region UTR), os quais incluem elementos necessários a replicação e tradução viral (LINDENBACH & RICE, 2005). Estas regiões não traduzidas delimitam uma única região aberta de leitura (open reading frame - ORF), a qual codifica uma única poliproteína de aproximadamente 3.011 resíduos de aminoácidos que, ao ser processada por proteases virais e celulares, origina proteínas estruturais (core, E1 e E2) e a proteína p7 e as proteínas não estruturais (NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A, NS5B), envolvidas na replicação viral (PENIN, et al., 2004). A heterogeneidade do genoma viral permite que o HCV seja filogeneticamente classificado em seis genótipos (numerados de 1 a 6), os quais divergem entre 25 a 35% nas seqüências de nucleotídeos, além de mais de 50 subtipos denominados por letras do alfabeto (a, b, c), divergindo entre si de 15 a 20% na seqüência de nucleotídeos (ROSEN, 1999). O diagnóstico do HCV pode ser realizado por metodologias imunoenzimáticas, mas as técnicas moleculares de amplificação do ácido nucléico são consideradas mundialmente como padrão ouro para a detecção do vírus no plasma ou no soro humano. A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), precedida de uma reação de transcrição reversa (RT-PCR), é a mais utilizada, por apresentar grande sensibilidade e especificidade, tanto no diagnóstico como no acompanhamento terapêutico da Hepatite C (DAVIES, 2005). As células-alvo do HCV são os hepatócitos, porém estudos já demonstraram a presença do vírus em outras células, como as da medula óssea, dos rins, linfócitos, macrófagos, granulócitos, células dendríticas (SHEEHY et al., 2007) e plaquetas (HERNANDEZ et al., 1992). O receptor de superfície celular necessário à entrada do HCV em suas células-alvo e outros tipos celulares é a proteína CD81 (HAMAIA et al., 2001). Os portadores de hepatite C crônica apresentam freqüentemente trombocitopenia (PECK-RADOSAVLJEVIC, 2000). No entanto, recentemente, estudos têm demonstrado que tais pacientes apresentam o RNA do VHC no interior das plaquetas (HAMAIA et al., 2001; ALMEIDA et al., 2004), sugerindo dessa forma, um efeito viral direto na contagem de plaquetas (ZAHN et al., 2006). Entretanto, ainda não é conhecido o mecanismo de entrada do vírus nestas células, pois plaquetas não expressam o receptor de membrana CD81 (HAMAIA et al., 2001) devendo, portanto, existir outro receptor responsável pela adesão ou entrada do vírus nessas células. As plaquetas humanas são fragmentos citoplasmáticos anucleados presentes na circulação, resultantes da fragmentação de megacariócitos na medula óssea (ITALIANO & HARTWIG, 2002), e expressam vários tipos de antígenos em sua superfície, dentre eles os que merecem destaque são os antígenos específicos de plaquetas, os HPAs (Human Platelet Antigens) (SCHROEDER & RAYNER, 1993). Há 24 tipos de antígenos HPAs expressos em plaquetas, sendo que 12 deles estão agrupados em 6 sistemas bialélicos (HPA -1, -2, -3, -4, -5 e -15), nos quais o alelo de maior

freqüência é designado por “a” e o de menor por “b” (METCALFE, 2003). Estes antígenos são formados por segmentos protéicos polimórficos situados no interior de glicoproteínas (GP) da membrana plaquetária (METCALFE et al., 1995; LUCAS & METCALFE, 2000; HURD et al., 2002). Há mais de trinta tipos diferentes de glicoproteínas ligadas à membrana plaquetária, sendo que as relacionadas aos HPAs são os complexos GPIa-IIa, GPIIb-IIIa e GPIb-IX-V (SANTOSO, 1998). Tais glicoproteínas atuam como receptores da hemostasia primária, intervindo na agregação entre plaquetas, na ligação do fibrinogênio e de outras proteínas de adesão, além de algumas delas serem imunogênicas (KUNICKI & NEWMAN, 1992; SANTOSO, 2000). Neste contexto, os HPAs parecem ser possíveis receptores envolvidos na interação entre HCV e plaquetas e, como tais antígenos plaquetários se apresentam extremamente polimórficos na população, uma mudança na estrutura tridimensional destas glicoproteínas plaquetárias poderia facilitar, ou mesmo dificultar, a associação do vírus com essas células.

O trabalho de Verdichio-Moraes et al. (2009) demonstra uma associação entre o aumento da freqüência alélica do HPA-5b em portadores de HCV quando comparado ao grupo controle, sugerindo uma possível associação entre a presença deste alelo e a presença do vírus. Já Padovani (2010) evidenciou a associação do HPA -1b e a carga viral indetectável em plaquetas expostas ao vírus *in vitro*. No entanto, são poucos os estudos que relacionam os HPAs com a infecção pelo vírus da Hepatite C, e estes se restringem aos polimorfismos dos HPA -1, -3 e -5.

Diante desse panorama, a proposta deste estudo é investigar *in vitro* a presença do HCV em plaquetas provenientes de doadores de diferentes genótipos HPA-2. O sistema HPA-2 não se localiza em glicoproteínas da família das integrinas, como na maioria dos HPAs, mas se encontra na GPIb?, uma glicoproteína da família das glicoproteínas ricas em leucina (KUNICKI & NEWMAN al., 1992; ROZMAN, 2002).

2. Objetivos

O objetivo deste estudo foi avaliar *in vitro* a relação entre carga viral e o polimorfismo do sistema HPA-2 de plaquetas coletadas de 50 doadores de sangue não portadores de hepatite C.

3. Desenvolvimento

MATERIAIS E MÉTODOS

MATERIAL

Neste estudo, foram utilizadas amostras de sangue total provenientes de 50 doadores voluntários, convidados a participar do experimento. Somente foram incluídas amostras de doadores que forneceram seu consentimento livre e esclarecido por escrito. O projeto foi submetido ao Comitê de Ética e Pesquisa da Faculdade de Medicina de Botucatu, da Universidade Estadual Paulista (Unesp), protocolo CEP 3134-2009. O grupo controle foi constituído por um grupo de 257 doadores de sangue de repetição do Hemocentro de Botucatu, cuja genotipagem HPA já foi realizada em um estudo prévio (VERDICHIO-MORAES, 2009).

MÉTODOS

• Processamento das amostras

O sangue total foi coletado por profissional habilitado. Da amostra, foram separadas alíquotas de sangue total e plasma, antes do processamento para a obtenção das plaquetas. A alíquota de sangue total destinou-se à genotipagem para o HPA, bem como a alíquota de plasma, para comprovação por biologia molecular da negatividade prévia do doador para hepatite C.

As plaquetas foram obtidas segundo protocolo padronizado no Laboratório de Hemocomponentes do Hemocentro de Botucatu, posteriormente encaminhadas ao Laboratório de Biologia Molecular, onde as alíquotas foram incubadas com 1 mL de soro positivo com 100.000 cópias de RNA/mL do HCV de genótipo 1, a 37°C, por 48 horas. Depois da incubação, as plaquetas foram separadas novamente do soro, conforme protocolo padronizado no Laboratório de Hemocomponentes do Hemocentro de Botucatu, sendo armazenadas a -70°C, até o processamento. Durante todo o procedimento foram realizados controles negativos, a fim de garantir a precisão do experimento.

• Comprovação por Biologia Molecular (RT-PCR) da negatividade do doador para o VHC

A extração de RNA a partir do plasma do doador foi realizada utilizando o QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN, Valencia, CA, USA) segundo as especificações do fabricante. A ausência do RNA viral foi comprovada mediante a não amplificação da região genômica 5'UTR do HCV.

- Detecção do HCV nas plaquetas expostas *in vitro* com o vírus

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

- Revelação da RT-PCR

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

- Genotipagem Plaquetária

A genotipagem do sistema HPA-2 foi realizada por PCR-SSP (Polymerase Chain Reaction – Sequence Specific Primers). Os produtos da PCR foram visualizados em eletroforese em gel de poliacrilamida 6%. A corrida eletroforética foi realizada a 90V, 3mA por 50 minutos em tampão TBE (Tris-Borato 45mM/EDTA 1mM). Os géis foram corados com AgNO₃ para visualização.

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

A transcrição reversa, seguida de amplificação, foi realizada com o kit One Step RT-PCR (Promega Corporation, Madison, WI, USA). A reação foi baseada na tecnologia Taqman®, na qual os primers e a sonda foram dirigidos contra a região 3'UTR do vírus. A detecção foi realizada em um sistema de dupla hibridização, utilizando uma sonda na qual, como o repórter, foi utilizado o 6-carboxi-4,7,2',7'-tetracloro-fluoresceína (VIC), que hibridiza especificamente o vírus presente nas plaquetas, e outra sonda com o repórter 6-carboxifluoresceína (FAM), o qual se anela ao vírus calibrador. O RNA viral foi quantificado com uma curva-padrão obtida com a utilização de três padrões (30000, 300000, 3000000). Assim, a quantificação absoluta do RNA viral foi realizada de acordo com a leitura das fluorescências emitidas no equipamento, comparada com a curva-padrão gerada no mesmo.

4. Resultado e Discussão

Os resultados mostraram que todas as plaquetas foram positivas para o RNA do HCV após a incubação com vírus, demonstrando que este interage com as plaquetas *in vitro*. No entanto, não houve desvio de Hardy-Weinberg no sistema HPA-2 e as frequências alélicas e genotípicas não foram estatisticamente significativa ($p > 0,05$) entre as plaquetas com carga viral detectável e indetectável (menor 18,41UI/mL). Estes dados sugerem que o sistema HPA-2 não parece estar envolvido entre a interação entre plaqueta e HCV.

5. Considerações Finais

Os resultados apresentados mostraram que o HCV é capaz de interagir com plaquetas mesmo com a ausência do receptor celular CD81. No entanto, o sistema HPA-2 não parece estar envolvido em algum passo inicial da infecção pelo HCV, demonstrando que outras proteínas podem estar envolvidas nesta interação. Vale ressaltar que os resultados aqui apresentados foram obtidos por experimentos *in vitro* e, portanto, é necessário investigar até que ponto estes achados podem ser evidenciados por estudos feitos em pacientes infectados pelo vírus.

Referências Bibliográficas

- ALMEIDA, A. J. et al. Hepatitis C virus-associated thrombocytopenia: a controlled prospective, virological study. *Ann. Hematol.* 2004, vol.83, n.7 p.434-440.
- BEPA. Boletim Epidemiológico Paulista. Hepatites Virais B e C. 2005, Ano 2, n14.
- DAVIES, L. HIV-1 Treatment Bulletin. HCV coinfection –part 1. 2005, vol.6, n.8, Msc for HIV-1i-Bases.

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

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

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

HURD, C.M. et al. Genotyping for platelet-specific antigens: techniques for the detection of single nucleotide polymorphisms. Vox Sanguinis. 2002, vol. 83, p1-12.

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

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

KUNICK, T.J.; NEWMAN P.J. The molecular immunology of human platelet proteins. Blood. 1992, vol.80, p. 1386-1404.

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

LUCAS, G.F.; METCALFE, P. Platelet and granulocyte polymorphisms. Transfus. Med. 2000, vol.10, n.3, p157-174.

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

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

PADOVANI, J.L. Detecção *in vitro* do Vírus da Hepatite C (VHC) em plaquetas provenientes de indivíduos não infectados expostas ao vírus. 2010. Dissertação (mestrado) - Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

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

PENIN, F. et al. Structural biology of hepatitis C virus. Hepatology. 2004, vol.39, p.5-19.

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

ROZMAN, P. Platelet antigens. The role of human platelet alloantigens (HPA) in blood transfusion and transplantation. Transplant Immunology. 2002, vol.10, p. 165-181.

SANTOSO, S. Clinical impact of platelet glycoprotein polymorphism. Vox Sang. 2000, vol 78, n. 2, p 121-124.

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

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

SHEEHY, P. et al. In vitro replication models for the hepatitis C virus. J.Viral Hepat. 2007, vol.14, n.1, p. 2-10.

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

VERDICHIO-MORAES, C. F. Antígenos plaquetários humanos (HPA) em portadores do vírus da hepatite C (HCV). 2009. Tese (doutorado) - Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

ZAHN, A. et al. Hepatitis C virus interacts with human platelet glycoprotein VI. Journal of General Virology. 2006, vol. 87, p. 2243-2251.