



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

Caroline Mitiká Watanabe

**Avaliação da infecção de megacariócitos e plaquetas
pelo VHC e a influência na fisiopatologia da hepatite C.**

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

Orientador: Prof. Dr. Paulo Eduardo de Abreu Machado

Coorientadora: Profa. Dra. Márjorie de Assis Golim

**Botucatu
2016**

Caroline Mitiká Watanabe

Avaliação da infecção de megacariócitos e plaquetas pelo VHC e a influência na fisiopatologia da hepatite C.

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

Orientador: Prof. Dr. Paulo Eduardo de Abreu Machado

Coorientadora: Profa. Dra. Márjorie de Assis Golim

Botucatu

2016

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

Watanabe, Caroline Mitiká.

Avaliação da infecção de megacariócitos e plaquetas pelo VHC e a influência na fisiopatologia da hepatite C / Caroline Mitiká Watanabe. - Botucatu, 2016

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de Botucatu

Orientador: Paulo Eduardo de Abreu Machado

Coorientador: Márjorie de Assis Golim

Capes: 40101096

1. Hepatite C - Fisiopatologia. 2. Hepatite por vírus. 3. Megacariócitos - Infecção. 4. Plaquetas. 5. Doenças crônicas.

Palavras-chave: Infecção in vitro ; Megacariócitos; Plaquetas; Vírus da hepatite C.

Dedicatória

Aos meus pais, José e Mitie, meu porto-seguro, minha base.
Obrigada pelo apoio incondicional de vocês e por acreditarem nos meus sonhos.

Agradecimentos

Ao meu orientador Prof. Dr. Paulo Eduardo de Abreu Machado, pelos momentos enriquecedores de reflexão acerca deste trabalho e apoio para o desenvolvimento deste estudo.

À minha (co)orientadora Profa.Dra. Márjorie de Assis Golim, por me aceitar guiar nesta caminhada de aprendizado. Seu apoio foi fundamental para a concretização deste projeto e para meu amadurecimento profissional. Obrigada!

À Léia, por estar sempre por perto para acolher e para ensinar.

À minha parceira de “bancada” Aline, por ser um exemplo de força, determinação e por ter compartilhado todos os momentos de alegria, tristeza, angústia e vitórias nesta caminhada.

A Luana Barbosa, pelo compreensão, apoio nos momentos de ausência e por sempre estar por perto quando precisei de sua ajuda.

À Professora Rosana Rossi, por ter me guiado no final da minha graduação, sem o seu conselho, não estaria aqui.

Aos doadores pela sua generosidade em ajudar o próximo sem ver a quem e por ter me ensinado a nunca perder a fé e a alegria nos momentos de dificuldades.

À equipe do Transplante de Medula Óssea do Hospital Amaral Carvalho por todo apoio e atenção durante o desenvolvimento deste projeto.

À equipe do ambulatório de Gastroenterologia da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP, pelo apoio no desenvolvimento deste projeto.

À Profa. Dra. Flávia Karina Delella e ao Sérgio Alexandre de Alcantra Santos, pelo apoio nas padronizações técnicas da imunofluorescência.

À Shelly Carvalho, pelo apoio nas análises de microscopia confocal.

À equipe do Laboratório de Imunohistoquímica, em especial, ao Marcos Roberto Franchi, Luis Fernando Franchi e Celene Carvalho Gandim pela disponibilidade e apoio na confecção das lâminas.

Ao Claudinei J. Figueira, pelo apoio técnico nas marcações de imunocitoquímica.

À Josy Campanhã Vicentini de Oliveira, por dividir seu conhecimento sobre cultura celular conosco.

À Juliana Lara Padovani, por compartilhar seu conhecimento sobre plaquetas e hepatite C.

Aos colegas do Laboratório de Biologia Molecular, Maércio, Sarita, Regina, Cris e Gabi, pelo apoio e auxílio durante os experimentos.

Ao Laboratório de Doenças Tropicais, pelo apoio durante as padronizações e pela amizade.

À Prof. Dra. Rejane M. Tommasini Groto, pelo apoio no desenvolvimento deste projeto.

À Flávia Hebler Barbosa Trovão, pelo apoio técnico e disponibilidade em nos auxiliares durante os experimentos.

À Rita de Cassia Alvarado por todas as orientações e apoio administrativo.

Aos amigos do Laboratório de Imunohematologia do Doador, Denise, Marquinhos, Dada e Dra. Valéria pelo apoio e pelas palavras de incentivo.

À Hérica Sola, por todo apoio e carisma durante este percurso.

À equipe da sorologia, Angela Dorini e Silvio Neves, pelo apoio e atenção.

Ao mestre Fernando Oliveira, por ter me ensinado o “beabá” da bancada e por ter me incentivado a realizar o mestrado.

À Dra. Patrícia Carvalho Garcia e a Dra. Michele Janegitz Acorci Valério, pelo apoio acadêmico e ter me permitido vivenciar a experiência da docência.

À Aparecida Vitória Gonçalves de Souza, pela disponibilidade em sempre nos ajudar, seja como for e onde for. Vi, obrigada!

À Dirce e ao Gilberto, pela disponibilidade em nos ajudar nas coletas.

As minhas amigas Aline Trombini, Juliana Ravelli e Flávia Saliba, pelo apoio, conselhos e companhia.

A Luciane e Cíntia, pela companhia, união e apoio na minha estadia em Botucatu.

Ao meu companheiro, amigo e porto-seguro, Edu, por sempre ser compreensivo e me apoiar nesta jornada, me motivando e sempre me fazendo acreditar que posso ir mais longe.

As minhas amigas e irmãs de coração Luiza, Pri, Luisa e Isa, pois não importa a distância e nem o tempo que ficamos longe, tudo é festa e alegria quando nos vemos. Obrigada pelo apoio, por sempre me reerguerem quando precisei e por iluminarem minha vida.

Aos meus amigos Ícaro, Luís Gustavo e Marquinhos, por sempre estarem presente nos momentos de alegria.

A minha Batian e meu Ditian "*in memorian*" pelo zelo e carinho desde de sempre.

Ao meu tio Kazuo, minha tia Ana Paula e Akico, pelo apoio e força nesta caminhada, sempre torcendo pela minha prosperidade.

Aos meus sogros, Cláudia e Adair, que sempre me incentivaram e cuidaram de mim como uma filha. É uma alegria poder fazer parte desta família.

Ao meu irmão Dreyfuss e cunhado Léo, por todo apoio durante o percurso desta jornada.

Epígrafe

A verdadeira felicidade existe na gentileza mútua.

Hidemaru Deguchi

Resumo

WATANABE, C.M. Avaliação da infecção de megacariócitos e plaquetas pelo VHC e a influência na fisiopatologia da hepatite C. 2016. 81f. Dissertação (Mestrado)-Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2016.

A hepatite C acomete cerca de 130-150 milhões de pessoas em todo o mundo, sendo que grande parcela dos portadores do vírus da hepatite C (VHC) permanecem assintomáticos por longos períodos. O diagnóstico da doença acontece muitas vezes devido a sintomas extra-hepáticos como fadiga crônica, alterações endócrinas, dermatológicas e hematológicas, porém, a patogênese das manifestações extra-hepática é pouco conhecida. Assim, modelos que reproduzam a infecção *in vitro* pelo VHC se tornam necessários para que se possa compreender e esclarecer a relação entre estas desordens e o VHC. O VHC é um *Hepacivírus* da família *Flaviviridae*, sua entrada em células suscetíveis, como os hepatócitos, pode ocorrer por infecção direta, mediada principalmente pelos receptores CD81 e Claudina-1 (CLDN1), desencadeando uma série de processo para internalização e replicação viral, ou por infecção por contato célula-a-célula, mediada por CLDN1 e Ocludina (OCLN), não sendo necessário, por esta via, CD81. Estudos evidenciam a interação entre plaquetas e VHC, no entanto, não demonstram claramente se estas células somente aderem às partículas virais ou se são infectadas pelo vírus. Assim, estudos que contribuam à elucidação deste processo são salutares. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar a infecção de megacariócitos e plaquetas pelo VHC e verificar a influência na fisiopatologia da hepatite C. Amostras de megacariócitos, provenientes de doadores de medula óssea, e amostras de plaquetas periféricas, ambas obtidas de doadores saudáveis, foram infectadas *in vitro* com plasma VHC positivo. As amostras infectadas foram avaliadas por citometria de fluxo e microscopia confocal. Os parâmetros analisados foram presença ou ausência viral e a expressão dos receptores CLDN1 e CD81. Os resultados de ambas as técnicas foram complementares. Encontrou-se presença de VHC tanto na superfície como no citoplasma de plaquetas, demonstrando, de modo inédito, a presença do VHC no citoplasma nestas células. Foi também observada a expressão de CLDN1 nas plaquetas, podendo este receptor ter papel fundamental na interação entre VHC e plaquetas pela via de infecção por contato, visto que estas células não expressam

CD81. Megacariócitos também apresentaram VHC na superfície e no interior celular. Eles expressam CD81 e CLDN-1, característica que os enquadram na categoria de células suscetíveis ao vírus via infecção direta. Relatos na literatura apontam que esta célula pode suportar a replicação viral, podendo ser considerada como reservatório de replicação extra-hepático. Estudos conduzidos independentemente demonstram que a infecção de VHC em plaquetas e megacariócitos está relacionada à trombocitopenia periférica. Além disso, fatores secundários como comprometimento hepático, levam ao desequilíbrio na produção de trombopoetina, principal fator na manutenção do processo de trombopoese. Nosso estudo permitiu através do estabelecimento de infecção *in vitro* concluir que plaquetas, além de interagirem com VHC, expressam o vírus no seu interior, tornando-se veículos e reservatórios virais. Ademais, megacariócitos se infectam com o vírus, o que pode impactar na produção de plaquetas infectadas, visto que estes são os precursores plaquetários. Esses achados, em conjunto, podem contribuir para o entendimento da trombocitopenia, manifestação extra-hepática comumente observada nos pacientes com hepatite C crônica.

Palavras-chave: Infecção *in vitro*; Megacariócitos; Plaquetas; Vírus da hepatite C.

Abstract

WATANABE, C.M. Megakaryocytes and platelets HCV infection evaluation and influence in the pathophysiology of hepatitis C. 2016. 81f. Thesis (Master) – Faculty of Medicine of Botucatu, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2016.

Hepatitis C affects about 130-150 million people worldwide. It's caused by Hepacivirus and the diagnosis are by extrahepatic symptoms such as chronic fatigue, endocrine, dermatologic and hematologic changes. However, the pathogenesis of extrahepatic manifestations is little known and requires further studies on the relationship of these disorders and the hepatitis C virus (HCV), therefore infection *in vitro* model can improve this kind of knowledge. HCV is a family of Flaviviridae, its entry into susceptible cells, such as hepatocytes, can occur by direct infection mediated primarily by CD81 receptors and Claudin-1 (CLDN1), triggering a process serie for internalization and viral replication occur. Other road is by cell-to-cell mediated CLDN1 and occludin (OCLN), not being necessary the presence of CD81. Studies describe the interaction between platelets and HCV, however, does not clearly denotes how this process happens, due to this, studies can contribute to the elucidation of this process relevance. The aim of this study is the evaluation of the infection of megakaryocytes and platelets HCV and the influence in pathophysiology of hepatitis C. Megakaryocytes samples, from bone marrow donors, and samples of peripheral platelets, both obtained from healthy donos are infected in vitro with HCV positive plasma. Infected samples were evaluated by flow cytometry and confocal microscopy. The parameters analyzed were the presence or absence of viral and expression of CLDN1 and CD81 receptors. The results of both techniques are complementary. It was founded the presence of HCV both in surface and in cytoplasm of platelets by flow cytometry and confocal microscopy, fact not previously reported. The receptor analysis showed the presence of CLDN1, one of the proteins involved in the viral transmission cell-cell, so the interaction can occur in this via. CD81 was absent, as reported in literature. Megakaryocytes also had HCV on the surface and inside the cells. They express CD81 and CLDN-1, so then are susceptible to viruses via direct infection. Reports in the literature suggest that this cell can support viral replication, and can be considered as extrahepatic replication reservoir. Studies conducted independently demonstrated that HCV infection in platelets and megakaryocytes is related to peripheral thrombocytopenia. In addition, secondary factors such as hepatic damage, affect the levels and production of thrombopoietin, the main factor in maintaining trombopoese process. The study found virus at surface and in the cytoplasm of platelet infected *in vitro*, indicating that platelet can interacting with HCV an can be a vehicles to the infection or reservoir of HCV. In addition, megakaryocytes are infected *in vitro* with the virus, which can produce platelets infected ou be a reservoir of HCV, since these are the

platelet precursors. This findings demonstrate an infection model efficient and can contribute to the understanding of thrombocytopenia and extrahepatic manifestations, commonly observed in patients with chronic hepatitis C

Keywords: *In vitro* infection; megakaryocytes; platelets; Hepatitis C virus.

Lista de Ilustrações

Figura 1- Hematopoese.	15
Figura 2- <i>Overview</i> da trombopoese.	17
Figura 3- Localização e estrutura proplaquetária.....	18
Figura 4- Estrutura e genoma do VHC.	21
Figura 5- Entrada do VHC no hepatócito pelas vias de infecção direta ou célula-célula.....	22
Figura 6- Estrutura das proteínas de junção: Ocludina (OCLN) e Claudina-1.....	24
Figura 7 - Mecanismo de trombocitopenia induzida por vírus.....	27
Figura 8- Estratégia de análise de plaquetas infectadas	32
Figura 9- Preparo e obtenção dos megacariócitos.	37
Figura 10- Viabilidade Celular (PBMCs) utilizando Anexina V e 7AAD.....	39
Figura 11- Morfologia Celular das PBMCs submetidas a diferentes métodos de cultura por 48 horas.....	40
Figura 12- Estratégia de análise de megacariócitos.	42
Figura 13 - Expressão viral em plaquetas.	45
Figura 14- Expressão de plaquetas (CD61+) e VHC (anti-NS4A) em tecido hepático.....	47
Figura 15- Expressão de plaquetas (CD61+) e VHC (anti-NS4A) em tecido hepático evidenciando o acúmulo no entorno de um vaso sanguíneo.....	49
Figura 16- Microscopia confocal de corte histológico hepático de paciente VHC+.	50
Figura 17 - <i>Overlay</i> da expressão de CLDN1 basal e de superfície e intracelular de plaquetas incubadas com plasma VHC + (A) e plasma VHC – (B).....	54
Figura 18- Expressão de Claudina-1 em plaquetas infectadas com VHC por microscopia confocal.	55
Figura 19- Expressão negativa do CD81 em plaquetas	56
Figura 20- Microscopia confocal de plaquetas CD61+/CD81-	56
Figura 21- Expressão de VHC em megacariócitos infectados <i>in vitro</i>	60
Figura 23- Microscopia confocal da superfície de megacariócitos infectados <i>in vitro</i> com VHC.	61
Figura 24- Microscopia confocal de megacariócitos infectados <i>in vitro</i> com VHC em diferentes camadas celulares, evidenciando conteúdo intracitoplasmático.....	62
Figura 25- Expressão dos receptores claudina-1 e CD81 em megacariócitos.	66

Lista de quadros

Quadro 1- Avaliação da Viabilidade Celular de PBMCs.	38
Quadro 2- Valores percentuais e MIF da expressão de VHC na superfície e intracitoplasmático em plaquetas.	44
Quadro 3- Valores percentuais e MIF da expressão de VHC na superfície e intracitoplasmático em plaquetas infectadas <i>in vivo</i>	45
Quadro 4- Valores percentuais da expressão de CLDN1 e média de intensidade de fluorescência em megacariócitos.	64
Quadro 5- Valores percentuais da expressão de CD81 e média intensidade de fluorescência em megacariócitos.	64

Lista de tabela

Tabela 1 - Expressão de CLDN1 em plaquetas pré-infecção (valor basal).	52
Tabela 2 - Expressão de CLDN1 em plaquetas pós-infecção <i>in vitro</i> com plasma VHC positivo.	52
Tabela 3- Expressão de CLDN1 pós-infecção <i>in vitro</i> com plasma VHC negativo.	54
Tabela 4 - Expressão de VHC na superfície e intracitoplasmático em megacariócitos (percentual e MIF).	59

Lista de Abreviações

Anti-NS4A-FITC: monoclonal anti-vírus da hepatite C NS4A (FITC)

Atb/Atc: Antibiótico e Antimicótico

APC: alofococianina (do inglês: *Allophycocyanin*)

BSA: albumina sérica bovina

CLND1: receptor claudina-1

CTH: célula tronco hematopoéticas

CXCL12: fator-1 derivado do estroma (SDF-1)

DAAs: antirretroviral de ação direta

DMS: membranas de demarcação

DMSO: dimetilsulfóxido

EGRF: fator de crescimento epidérmico

Fig.: figura

GP: glicoproteínas

HIV: vírus da imunodeficiência humano

HTLV: vírus T-linfotrópico humano

HPA-I: antígeno plaquetário humano

HCC: hepatite C crônica

PBMC: células mononucleares do sangue periférico (do inglês Peripheral Blood Mononuclear Cells)

Ig: imunoglobulina

IL: interleucina

INF: Interferon

MEP: tronco-bi-potentes denominada progenitora MK-eritroide

MIF: média de intensidade de fluorescência

MO: medula óssea

MK: megacariócitos

NAb: anticorpos neutralizantes

OCLN: Ocludina

PE: ficoeritina (do inglês, *Phycoerythrin*)

PerCP: peridina clorofila proteína (do inglês: *Peridinin Chlorophyll Protein*)

Proplt: proplaquetas

SRB1: receptor scavenger B1

SFC: fator de células-tronco

TEM: microdomínios enriquecidos de tetraspanina (do inglês- *tetraspanin-enriched microdomain*)

TGF- β : fator transformação do crescimento beta

UI: unidade internacional

VHC: vírus da hepatite C

1. Sumário

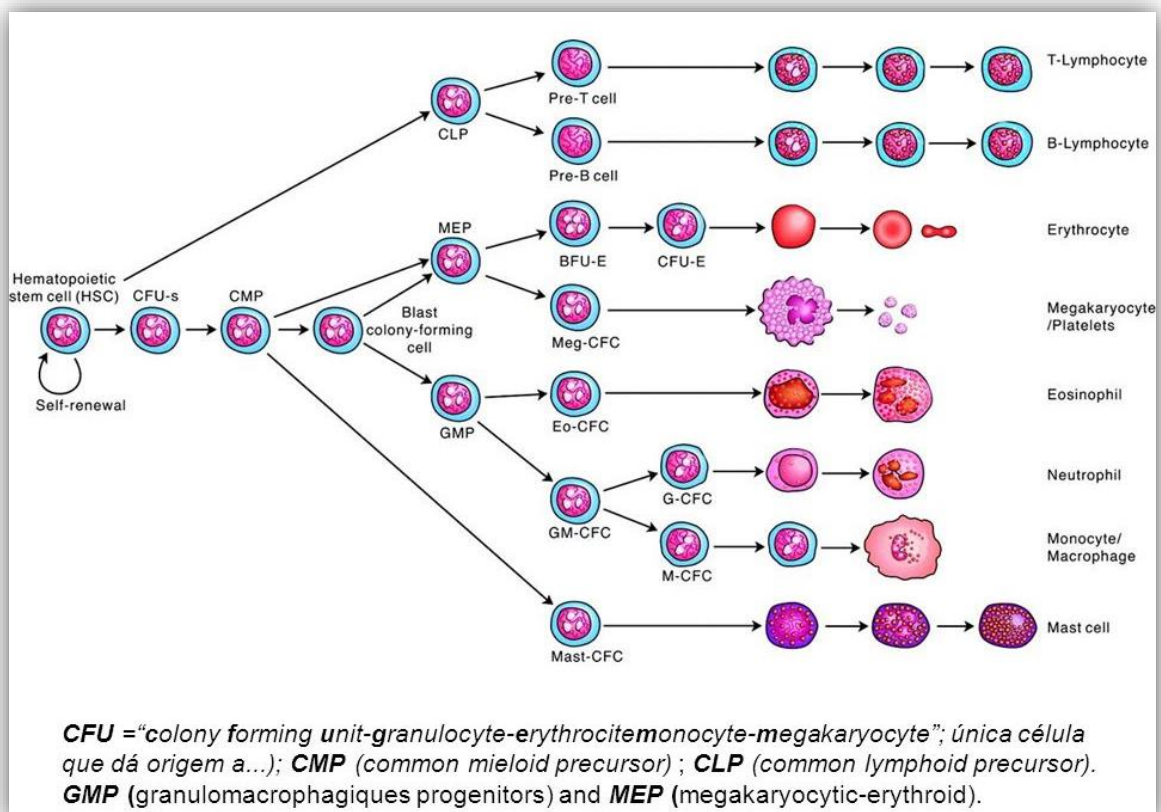
1. Introdução.....	15
1.1. Megariócitos e trombopoese.....	16
1.2. Hepatite C.....	19
1.2.1. O vírus da hepatite C e a infecção viral	20
1.2.2. Manifestações extra-hepáticas relacionadas com a Hepatite C	25
2. Objetivos.....	28
2.1. Objetivo Principal:.....	28
2.2. Objetivos específicos:.....	28
3. Material e Métodos	29
3.1. Comitê de Ética	29
3.2. Metodologia para identificação da presença de Vírus da Hepatite C (VHC) por Citometria de Fluxo em plaquetas.	29
3.2.1. Infecção “ <i>in vitro</i> ” das plaquetas saudáveis pelo VHC	29
3.2.2. Preparo da amostra	29
3.2.3. Obtenção de plaquetas.....	29
3.2.4. Infecção <i>in vitro</i> das plaquetas.....	29
3.2.5. Imunofenotipagem em plaquetas infectadas “ <i>in vitro</i> ” por citometria de fluxo .	30
3.2.6. Controles Isotípicos e Anticorpos monoclonais utilizados em plaquetas e megacariócitos.....	33
3.3. Identificação e localização do VHC em plaquetas oriundas de pacientes com Hepatite C	33
3.3.1. Preparo e obtenção de plaquetas do sangue periférico proveniente de indivíduos com Hepatite C.	33
3.4. Avaliação da presença dos receptores CLDN1, CD81 e VHC em plaquetas por microscopia confocal.....	34
3.5. Metodologia para identificação da presença de Vírus da Hepatite C (VHC) por Citometria de Fluxo em megacariócito	35
3.5.1. Coleta e obtenção dos megacariócitos	35
3.5.2. Isolamento de megacariócito da medula óssea	36

3.5.3.	Padronização da Infecção “ <i>in vitro</i> ” do megacariócito.....	37
3.5.4.	Infecção <i>in vitro</i> dos megacariócitos pelo VHC.....	39
3.5.5.	Imunofenotipagem em megacariócitos infectadas “ <i>in vitro</i> ” por citometria de fluxo 40	
3.5.6.	Microscopia confocal de Megacariócitos.....	43
4.	Resultado e discussão.....	43
4.1.	Plaquetas.....	43
4.1.1.	Avaliação da infecção pelo VHC em plaquetas por citometria de fluxo e microscopia confocal	43
4.1.2.	Avaliação da presença e ausência dos receptores virais em plaquetas.....	51
4.2.	Megacariócitos.....	59
4.2.1.	Avaliação da presença do vírus da hepatite C na superfície e intracitoplasmático em megacariócito por citometria de fluxo e microscopia confocal.	59
4.2.2.	Avaliação dos receptores virais claudina-1 e CD81 em megacariócitos incubados com plasma VHC positivo e negativo.....	63
5.	Conclusão.....	68
	Referências	69
	Anexo	75
	A) Parecer Consubstânciado do CEP.....	75
	Apêndice.....	79

1. Introdução

A formação de células do sangue, hematopoese, ocorre em diferentes locais durante a vida. Na fase fetal esta ocorre no saco vitelínico, fígado e baço e em indivíduos adultos, ocorre predominantemente na medula óssea de ossos chatos e longos como vértebras, costelas, crânio, esterno, sacro, pelve, fêmur. A origem de novas células hematopoéticas inicia-se com a diferenciação de uma célula tronco hematopoéticas (CTH) que apresenta como características quiescência, capacidade de auto renovar-se e originar linhagens eritróides, linfóides e mielóides (Figura 01) este processo é mediado por uma série de fatores como citocinas, quimiocinas, receptores e vias de sinalização (HOFFBRAND; MOSS, 2013; MACHLUS *et al.*, 2014; SVOBODA; BARTUNEK, 2015).

Figura 1-Hematopoese.



A hematopoese inicia-se a partir de célula-tronco pluripotente. A interação complexa entre processos genéticos intrínsecos das células e do microambiente, envolvendo citocinas e quimiocinas, determina o estado quiescente, a proliferação, diferenciação ou auto-renovação das células-tronco, células progenitoras e células maduras especializadas. Fonte: HOFFBRAND; MOSS (2013).

A medula óssea é um local com uma arquitetura complexa e composto por células importantes para o controle da homeostase hematopoiética e óssea. Trata-se de um ambiente onde as células-tronco hematopoiéticas em conjunto com células neurais, gliais e adipócitos proporcionam ambiente equilibrado e favorável para produção das linhagens eritróide, mielóide e linfóide. Encontra-se na matriz extracelular fatores solúveis que promovem a quiescência e manutenção das funções das CTHs, como CXCL12, ou maturação e diferenciação das linhagens hematopoiética como fator estimulatório de colônias granulocítica e trombopoetina (TPO) (ANTONY; LINK, 2014; MALARA *et al.*, 2015). A TPO juntamente com interleucina-3 (IL-3), IL-6, IL-11 estimulam o processo de formação de plaquetas a partir de megacariócitos, processo denominado trombopoese, células estes importantes para o nosso estudo (PATEL *et al.*, 2005).

1.1. Megariócitos e trombopoese

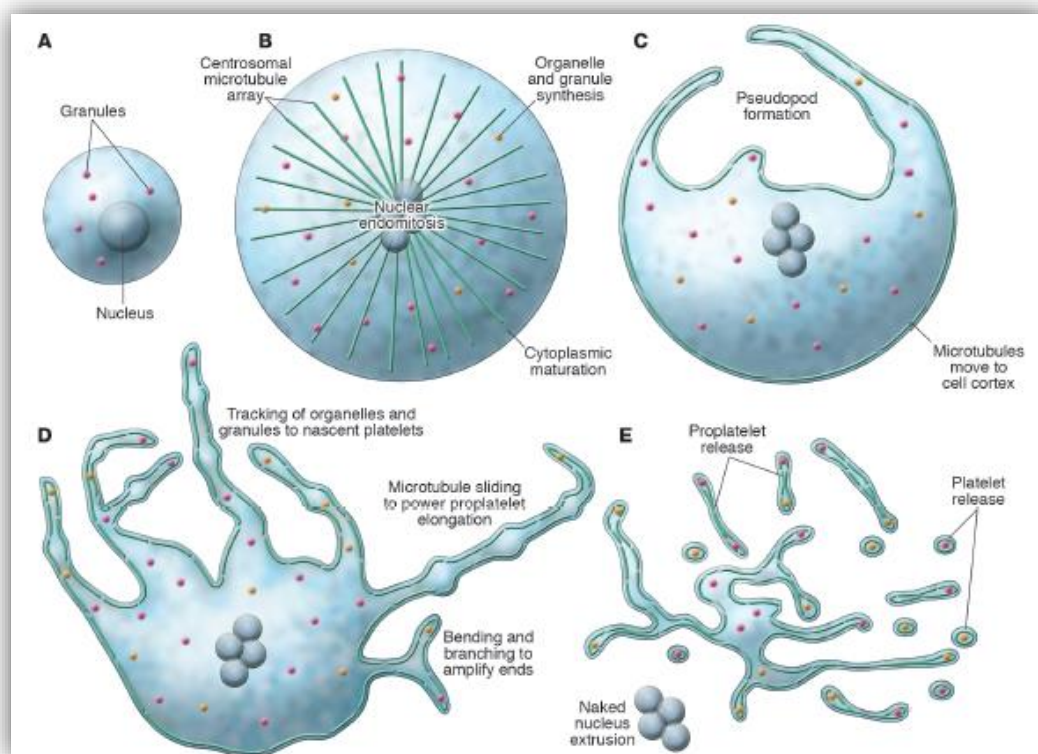
A megacariopoese, processo de formação dos megacariócitos (do inglês, *megakaryocyte* - MK), inicia-se com a diferenciação das células-tronco hematopoiéticas em células tronco-bi-potentes denominada progenitora MK-eritróide (MEP), esta origina duas linhagens precursoras: eritróide e megacariocítica (BLUTEAU *et al.*, 2009; FAVIER; RASLOVA, 2015). Os megacarioblastos gerados residem no endóstio de ossos chatos e longos, também encontrado nas arteríolas e sinusóide desta rica região vascularizada da medula óssea (ANTONY; LINK, 2014; MALARA *et al.*, 2015). Representam cerca de 0,05% das células nucleadas da medula óssea e 1% da linhagem mielóide, sendo uma população celular rara (TOMER *et al.*, 1988; PATEL *et al.*, 2005). Morfologicamente, são grandes ($\geq 50\mu\text{m}$ a $100\mu\text{m}$), poliplóides e antes de se diferenciarem em plaquetas, passam por processo de maturação mediado por fatores como a trombopoetina que se liga ao receptor c-MPL, promovendo a replicação endomitótica sincrônica ou endomitose (PATEL *et al.*, 2005, MACHLUS; ITALIANO JUNIOR, 2013; HOFFBRAND; MOSS, 2013).

A endomitose é uma propriedade dos megacariócitos (WORTHINGTON *et al.*, 1983). Acontece após a primeira divisão mitótica sucedendo assim uma série de replicações do DNA sem que haja divisão nuclear ou citoplasmática (HOFFBRAND; MOSS, 2013; FAVIER; RASLOVA, 2015), iniciando-se em 2N e procedendo até o

estágio de 128N, formando núcleo polilobulado, destruído após a fragmentação do citoplasma e formação das plaquetas (PATEL *et al.*, 2005).

A trombopoese, processo de formação das plaquetas inicia-se com uma série de alterações nos MKs. Após a endomitose, ocorre o processo de biogênese de síntese de proteínas e produção de organelas das plaquetas. Nesta fase aparecem as membranas de demarcação (DMS), delineando o local de formação das proplaquetas e formando uma rede de microtúbulos que servem como canais de transporte de vesículas e organelas das futuras plaquetas (ITALIANO JUNIOR *et al.*, 1999; BLUTEAU *et al.*, 2009). O megacariócito reorganiza seu citoesqueleto de actina, tubulina e miosina para a formação das proplaquetas (GEDDIS, 2009) (FIGURA 2).

Figura 2- Overview da trombopoese.

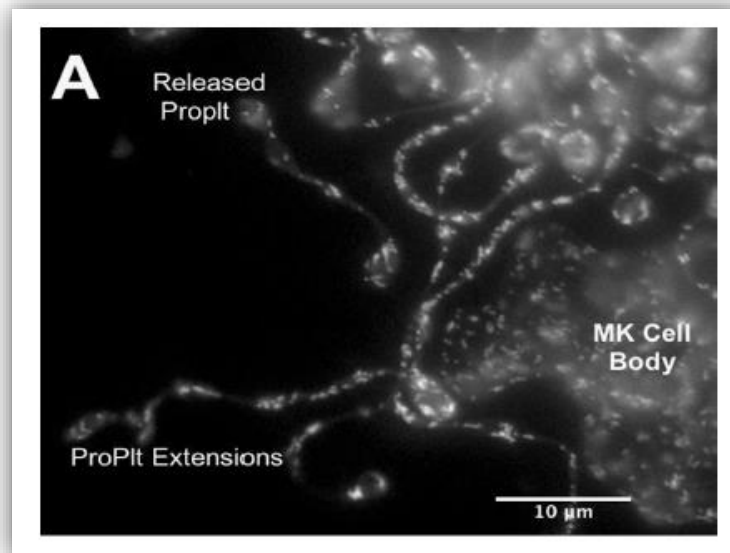


A) Megariócito imaturo B) Processo de endomitose, síntese de organelas, maturação do citoplasma e rearranjo dos microtúbulos; C) Início da formação das proplaquetas, translocação dos microtúbulos e formação de pseudópodes que darão origem as proplaquetas; D) deslizamento dos microtúbulos promovendo o alongamento proplaquetário, transporte de grânulos e proteínas; E) Fase final da trombopoese: exclusão do núcleo, fragmentação do citoplasma megacariocítico e formação das plaquetas. Fonte: PATEL *et al.* (2005).

As proplaquetas (Proplt) representam regiões mais densas localizadas nas ramificações do citoplasma megacariocítico, permanecem unidas umas às outras

através de pontes citoplasmáticas e desempenham função de linhas de montagens, sendo essenciais para a formação das plaquetas (MACHLUS; ITALIANO JUNIOR, 2013). Os prolongamentos das proplaquetas são sustentados por microtúbulos originários da fase de maturação do citoplasma megacariocítico e o desprendimento do “corpo” do megacariócito se dá através da força do fluxo sanguíneo presente nos sinusóides, região com alta concentração de vasos, que leva ao rompimento e liberação de 1.000 a 5.000 novas plaquetas para a corrente sanguínea (ITALIANO JUNIOR *et al.*, 2007; GEDDIS, 2009; HOFFBRAND; MOSS, 2013).

Figura 3- Localização e estrutura proplaquetária.



As proplaquetas são regiões mais densas localizadas nas elongações do citoplasma megacariocítico promovido por microtúbulos. As proplts permanecem presas ao corpo do megacariócito até o seu desprendimento ocasionado pelo fluxo da corrente sanguínea, liberando assim, novas plaquetas. Fonte: MACHLUS; ITALIANO JUNIOR (2013).

As plaquetas possuem estrutura discóide e medem cerca de 1 a 3 µm, são anucleadas e contêm grande número de grânulos secretores. A concentração celular no sangue é em torno 250.000 plaquetas/µL (limites de 150 a 400.000/µL). Uma das características e dificuldades em trabalhar com as plaquetas *in vitro* é a alta capacidade de agregação celular, característica compartilhada pelos megacariócitos. Esta função é desempenhada por glicoproteínas (GP) de superfície como a GPVI, receptor de sinalização de plaquetas ativadas pelo colágeno, presente exclusivamente em plaquetas e megacariócitos e GPIIb/IIIa, importantes na ligação do fator de von

Willebrand e fibrinogênio (LANDI; MARQUES JUNIOR, 2003; CRAMER; FONTENAY, 2006; ZAHN, *et al.*, 2006; HOFFBRAND; MOSS, 2013; MURATA *et al.*, 2014).

A glicoproteína IIb/IIIa (complexo CD41/CD61) pertence à família das integrinas, é transmembranar e a mais numerosa da superfície plaquetária, cerca de 50.000 cópias. A GPIIIa (CD61) também denominada HPA-I (do inglês, *human platelet antigens*), é um dos marcadores de superfície classicamente utilizados para caracterização imunofenotípica de plaquetas e megacariócito por citometria de fluxo (LANDI; MARQUES JUNIOR, 2003; METCALFE *et al.*, 2003; FARIAS; BIERMANN, 2007).

Estudos têm mostrado que as plaquetas desempenham diversas funções além da angiogênese e hemostasia, contribuindo também em processos inflamatórios, regeneração tecidual, imunidade inata e em processos tumorais (BLUTEAU *et al.*, 2009; MACHLUS; ITALIANO JUNIOR, 2013). Em condições adversas e patologias como isquemias, cirrose hepática, colestase e hepatites virais estas células podem acumular-se no fígado, podendo contribuir com a fibrogênese no órgão (MURATA *et al.*, 2014).

1.2. Hepatite C

A hepatite C acomete cerca de 130-150 milhões de pessoas em todo o mundo, sendo que uma grande parcela dos portadores do vírus da hepatite C (VHC) evoluem para fase crônica da doença (55-85%) podendo desenvolver cirrose ou hepatocarcinoma celular. Estima-se que cerca de 500.000 pessoas/ano morrem devido ao acometimento desta moléstia (WHO, 2015).

O VHC é um *Hepacivírus* da família *Flaviviridae*, sua transmissão é via parenteral, isto é, seu contágio acontece através do sangue e hemoderivados contaminados. O uso de drogas injetáveis, materiais de uso pessoal não esterilizados, pessoas que realizaram tatuagens, transplantes, hemodiálise são enquadrados como populações de risco. A transmissão sexual ou vertical é rara, porém não pode ser negligenciada. (WASMUTH, 2010; PANTUA *et al.*, 2013; ZEISEL *et al.*, 2015; WHO, 2015).

A hepatite C crônica é uma doença de progressão lenta e muitas pessoas infectadas permanecem assintomáticas durante décadas, apenas 15-30% dos

pacientes têm o clareamento espontâneo, quando próprio organismo elimina o vírus sem medicamentos (KHULLAR; FIRPI, 2015). Em muitos casos, a hepatite C é detectada por sintomas não específicos da doença como fadiga crônica, alterações hematológicas, endócrinas e dermatológicas, porém a patogênese das manifestações extra-hepática é pouco conhecida, sendo necessários maiores estudos acerca da relação destas desordens e o VHC (PUCHNER; BERG, 2010; WESTBROOK; DUSHEIKO, 2014). No entanto, complicações a longo prazo da infecção são graves, incluem fibrose hepática, cirrose e carcinoma hepatocelular (MITCHELL *et al.*, 2015).

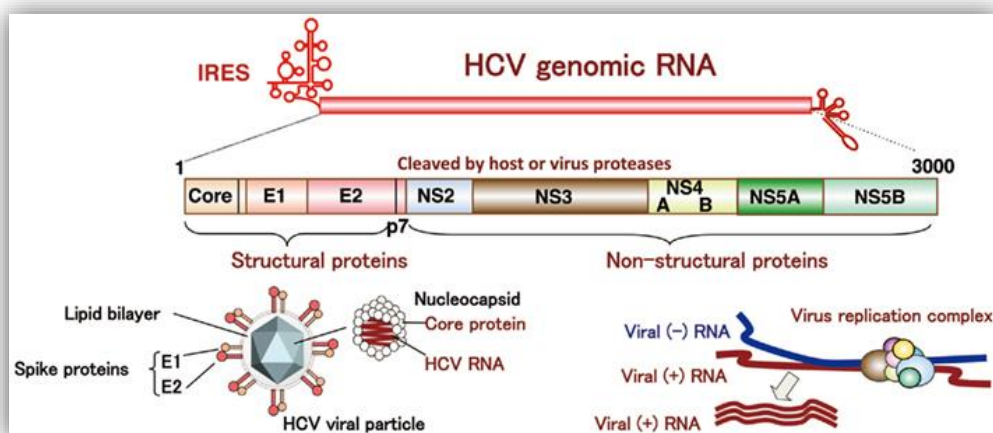
1.2.1. O vírus da hepatite C e a infecção viral

Atualmente há descrição de sete genótipos virais (1-7), os quais são distintos por diferenças nas sequências de nucleotídeos do RNA viral e categorizados em 67 subtipos, sendo 1a e 1b os mais comuns e resistentes às terapias convencionais (KUPFER, 2010; SMITH *et al.*, 2014; LYU, *et al.*, 2015).

O ciclo de vida do VHC compreende na entrada do vírus na célula, tradução das proteínas, replicação do RNA, montagem viral e finalmente liberação de novos vírions. Tais etapas requerem a interação de vários fatores entre o VHC e o hospedeiro (LERAT *et al.*, 1996; ZEISEL *et al.*, 2015).

O vírus apresenta diâmetro de 50-80nm (Figura 4), é constituído por fita simples de RNA “*single-stranded*” positivo que interage com proteínas do *core* para formar o nucleocápsideo, protegido pelo envelope viral, cuja composição é formada por membrana lipídica onde estão localizadas as glicoproteínas estruturais E1 e E2, importantes para a entrada viral na célula (DUBUISSON; COSSET, 2014; ZHU *et al.*, 2014). O vírus é composto de proteínas não estruturais principalmente NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A, NS5B, geralmente associadas ao ciclo de vida do VHC (XU *et al.*, 2001; VARAKLIOTI *et al.*, 2002).

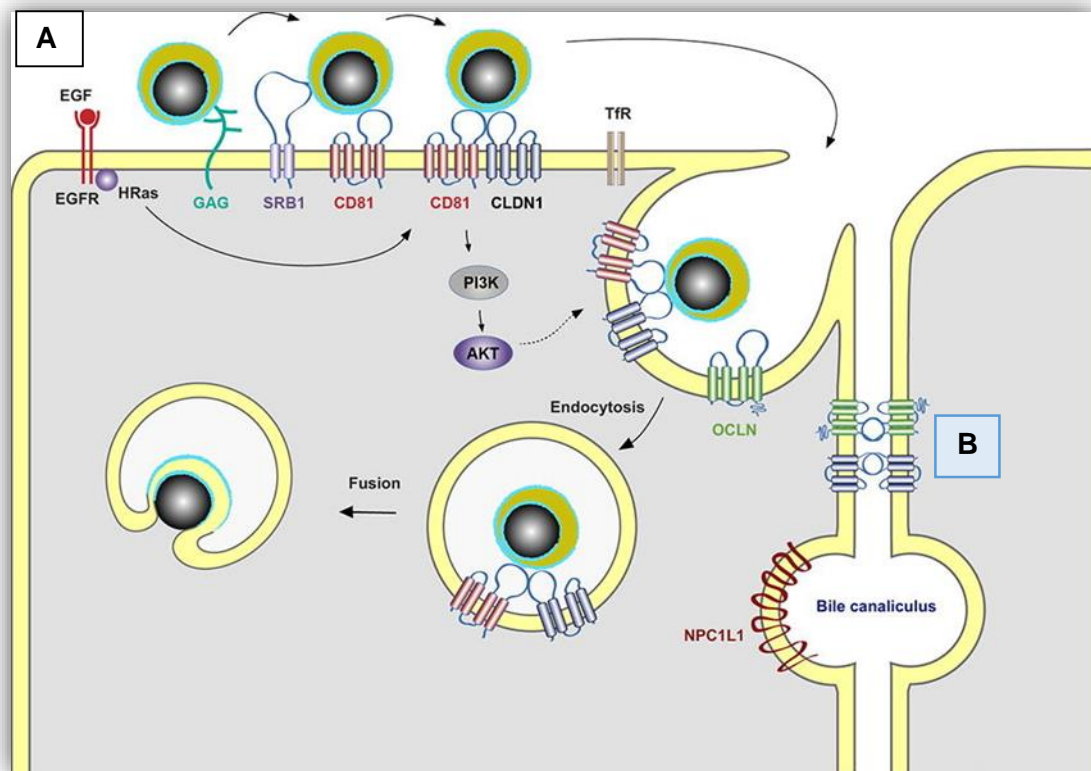
Figura 4- Estrutura e genoma do VHC.



O VHC é composto por fita simples de RNA com sentido positivo, por proteínas estruturais E1 e E2 ancoradas sob o envelope viral e proteínas não estruturais como NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A, NS5B importantes para a replicação viral e formação de novos vírions. Fonte: MORIISHI; MATSUURA (2012).

As partículas virais são transportadas pela corrente sanguínea até os sinusóides hepático, iniciando o ciclo de infecção direta (do inglês, *cell-free infection*). A fixação inicial do vírus é parcialmente compreendida. Uma hipótese é que a entrada do vírus é mediada pelo receptor *scavenger B1* (SRB1) que promove modificação na composição lipídica da glicoproteína E2, resultando numa melhor exposição do sítio de ligação com CD81. A fusão das proteínas E2 e CD81 é mediada e dependente de microambiente de pH baixo. CD81, desenvolve papel crucial no ciclo de vida do VHC, além de interagir com a glicoproteína E2 também interage com co-receptor claudina-1 (CLDN1), formando complexo CD81-CLDN1, promovendo a entrada viral. Este processo é mediado por fatores como o receptor de efrina E2 e fator de crescimento epidérmico (EGF) que ativam a via de sinalização HRas (figura 5) (HSU *et al.*, 2003; PANTUA *et al.*, 2013; PANTUA *et al.*, 2013; DUBUISSON; COSSET, 2014; ZHU *et al.*, 2014; LYU *et al.*, 2015; FÉNÉANT *et al.*, 2015).

Figura 5- Entrada do VHC no hepatócito pelas vias de infecção direta ou célula-célula.



A) Demonstração da via de infecção direta utilizando os receptores SRB1, CD81-CLND1 e posteriormente a internalização do VHC pelo processo de endocitose para iniciar o processo de replicação viral. B) Representação da via de infecção célula-célula no qual ocorre pela interação do vírus com a ocludina (em verde) e claudina-1 (em azul). Fonte: DUBUISSON; COSSET (2014).

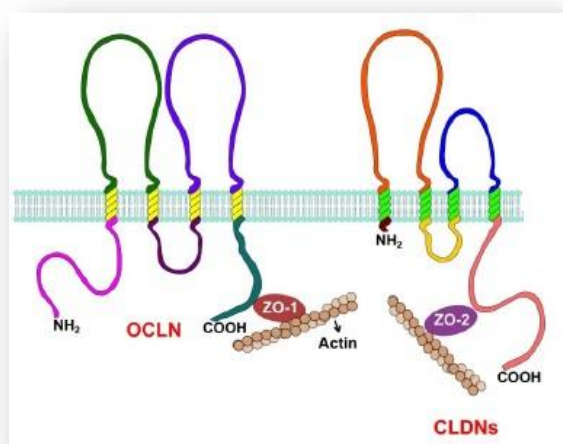
Após a internalização do vírus pelo processo de endocitose, o RNA viral pode ser traduzido em proteínas estruturais (E1 e E2) e não estruturais (NS2, NS3, NS4A, NS4B entre outras). A proteína não estrutural NS3 é essencial para a infecção viral, que em conjunto com o cofator NS4A é responsável pelo desencadeamento do restante das clivagens de outras proteínas virais (figura 5). A proteína não estrutural NS4A (P4) está envolvida na orientação da NS3 para o retículo endoplasmático, resultando num aumento significativo da estabilidade desta, enquanto que NS4B (p27) é uma proteína de membrana integral localizada no retículo endoplasmático, cujo domínio N-terminal é crucial para a replicação de VHC. O mecanismo deste processo ainda não é bem compreendido, porém acredita-se que NS4B possa servir como uma plataforma para a replicação do RNA do VHC (KUPFER, 2010).

A proteína tetraspanina CD81 (TAPA-1) é composta de 236 aminoácidos, tem peso molecular de 21-25kD, 4 domínios transmembranares, desempenha função estrutural de adesão, ativação, proliferação e diferenciação celular. É uma molécula ubíqua e está difundida livremente na membrana, porém em alguns locais esta proteína se encontra mais aglomerada formando plataformas denominadas microdomínios enriquecidos de tetraspanina, região altamente dinâmica na superfície celular que permite trocas com outros componentes da membrana, sendo este fator essencial para a entrada do VHC (LEVY *et al.*, 1998; HAHN; RICE 2008; BARTOSCH; DUBUISSON, 2010; FÉNÉANT *et al.*, 2014).

Claudina-1 (CLDN1) é uma proteína de junção que possui 4 domínios extracelulares (figura 6) e está localizada nas regiões basolateral e apical da membrana. As glicoproteínas virais não interagem diretamente com esta proteína, porém CLDN1 interage diretamente com CD81 formando importante complexo de ligação para entrada do vírus. Ainda não há evidências concretas que confirmem a interação direta de Claudina-1 com o VHC, porém sabe-se que o complexo CD81-CLDN1 está associado a maiores taxas de infecção (ZHU *et al.* 2014, TORRES-FLORES; ARIAS, 2015).

Outra proteína de junção importante para a infecção viral é a Ocludina (OCLN). Esta atua como co-receptor tardio para a infecção. OCLN é composta de quatro regiões transmembranares, sendo duas regiões extracelulares (figura 6). A glicoproteína E2 do VHC se liga na porção extracelular da OCLN ou interage indiretamente através do complexo CD81-CLDN1, promovendo a internalização de partículas de VHC, mediada e dependente de claritina. A depleção de OCLN não afeta a expressão ou localização da CLDN1, sugerindo que estes fatores atuem separadamente na infecção do VHC. Em vista disso, células humanas que expressam CD81, SR-BI, CLDN1 e OCLN são suscetíveis à infecção pelo VHC (ZHU *et al.*, 2014; FÉNÉANT *et al.*, 2015; LYU *et al.*, 2015).

Figura 6- Estrutura das proteínas de junção: Ocludina (OCLN) e Claudina-1 (CLDN).



Proteínas de junção transmembranares envolvidas na infecção direta ou célula-célula pelo VHC. Fonte: Adaptado de TORRES-FLORES; ARIAS (2015).

Além disso, estudos têm demonstrado que vírus livres circulantes podem infectar diretamente outros hepatócitos próximos, através da transmissão célula-célula (do inglês, *cell-cell transmission*) (Figura 5). Claudina-1, Ocludina e SRB1 são proteínas importantes envolvidas neste processo e desempenham papel na manutenção crônica da infecção. Não há consenso sobre a participação do receptor CD81 neste tipo de infecção (FÉNÉANT *et al.*, 2014; ZEISEL, 2015; FÉNÉANT *et al.*, 2015).

Outros vírus como HIV, HTLV, Vaccinia e Herpes vírus também se apropriam da transmissão célula-célula para dispersar novos vírions. De modo geral, um dos benefícios da propagação direta por contato é a ineficiente atuação dos anticorpos neutralizantes (NAb), presentes nos indivíduos infectados por estas patologias. O propósito dos NAb é se ligar às proteínas do envelope ou capsídeo viral, evitando a adsorção e penetração do vírion à célula, estes anticorpos atuam sob os vírus que entram através da infecção direta, porém não conseguem agir na infecção por contato devido à esta ocorrer em zonas polarizadas e de membranas de junção, permitindo a propagação do vírus em células mais distantes (ZHONG *et al.*, 2013; XIAO *et al.*, 2014)

O vírus da hepatite C têm como alvo os hepatócitos, sendo, portanto, um vírus hepatotrópico, porém há relatos na literatura da presença do vírus em linfócitos, macrófagos, monócitos, células dendríticas, rins, cérebro, megacariócitos e plaquetas sugerindo a existência de reservatórios extra-hepáticos para a replicação viral. A importância deste fato é que estes achados podem auxiliar na compreensão dos sintomas ou manifestações extra-hepáticas que os pacientes com hepatite C desenvolvem. (LERAT *et al.*, 1996; LI *et al.*, 1999; HSU *et al.*, 2003; ALMEIDA *et al.*, 2004; PADOVANI, 2010; FLETCHER *et al.*, 2012).

Estudos que avaliem a presença do VHC em compartimentos celulares são escassos, sendo que, os disponíveis na literatura, relatam avaliações por biologia molecular demonstrando de maneira quali/quantitativa a presença de RNA viral em plaquetas, no entanto, permanece a dúvida sobre a localização do VHC em plaquetas.

1.2.2. Manifestações extra-hepáticas relacionadas com a Hepatite C

Cerca de 40% a 76% dos pacientes com hepatite C crônica (HCC) desenvolvem pelo menos uma das manifestações extra-hepáticas, sendo estes fatores os principais indicativos do diagnóstico da hepatite C (PUCHNER; BERG, 2010).

Segundo o Consenso sobre a Hepatite C Crônica da Sociedade Brasileira de Hepatologia (2014), as principais manifestações extra-hepáticas são crioglobulinemia, vasculite, púrpura palpável, fadiga, artralgia, mialgia, neuropatia, complicações renais, linfomas, além de alterações do metabolismo da glicose e lesões dermatológicas.

Outro sintoma relatado a HCC é a trombocitopenia, quadro presente em 64% dos pacientes com cirrose e 6% em não-cirróticos, caracterizado por plaquetas abaixo de $150 \times 10^3/\mu\text{L}$. Diversos mecanismos indutores de plaquetopenia, como: sequestro de plaquetas para o baço, formação de auto-anticorpos dirigidos contra glicoproteínas plaquetárias levando a quadro similar à purpura trombocitopênica, desequilíbrio da produção de trombopoetina (TPO) nos estágios avançados de fibrose e presença de RNA viral em plaquetas e megacariócitos podendo induzir morte destas células (ALMEIDA *et al.*, 2004; AFDHAL; MCHUTCHISON, 2007; EL-BARBARY *et al.*, 2010; PUCHNER; BERG, 2010).

A revisão realizada por Assinger (2014) apresenta o conhecimento atual sobre a interação das plaquetas com diferentes tipos de vírus, explanando mecanismos que levam ao quadro de trombocitopenia induzida por estes organismos. São dois os principais mecanismos: diminuição da produção e/ou aumento da taxa de destruição de plaquetas (Figura 7).

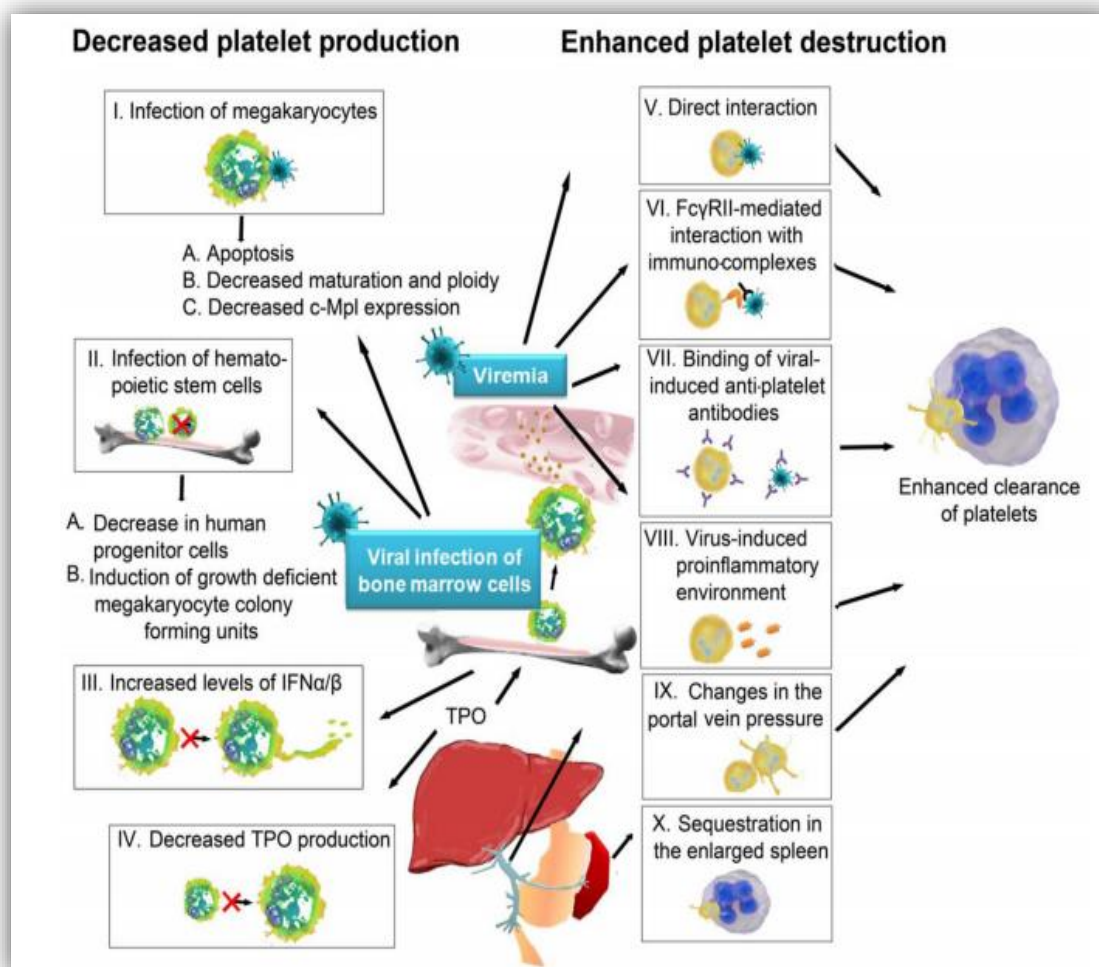
A diminuição da produção pode ocorrer devido:

A infecção direta de megacariócitos (7-I); o que pode levar a apoptose (7-IA); diminuição da maturação e ploidia de megacariócitos (7-IB); ou diminuição da expressão de receptor de trombopoetina c-Mpl nestas células (7-IC). O vírus também pode infectar diretamente células-tronco hematopoiéticas (7-II), resultando em diminuição de células progenitoras (7-IIA) e consequente redução de unidades formadoras de colônias megacariocíticas; devido ao desequilíbrio de produção de citocinas (7- IIB), de modo indireto, aumentam os níveis de interferon α/β suprimindo a formação de proplaquetas (7-III) ou por diminuição da produção de TPO, importante fator de crescimento e maturação dos megacariócitos (7-IV).

O segundo mecanismos é a destruição direta de plaquetas durante a viremia:

Pode ser devido a interação direta ou mediada por imunocomplexos de IgG (7-V/VI). Os epítomos viras, muitas vezes mostram reatividade cruzada com integrinas da superfície das plaquetas, que fornece um outro mecanismo de destruição induzida por vírus (7-VII). A presença destes organismos favorece a constituição de ambiente pró-inflamatório (7-VIII) bem como induz alterações na pressão da veia porta (7-IX) e aumento do baço (7-X) servindo como gatilho para ativação de plaquetas, permitindo que leucócitos circulantes capturem e rapidamente eliminem estas células da circulação causando então um quadro de trombocitopenia.

Figura 7 - Mecanismo de trombocitopenia induzida por vírus.



Fonte: ASSINGER, 2014.

Em face do exposto, justificam-se investigações a respeito da influência das plaquetas na hepatite C, tendo em vista sua evidente participação na fisiopatologia, no entanto, com poucos relatos na literatura sobre os mecanismos envolvidos que contribuam ao entendimento da doença.

2. Objetivos

2.1. Objetivo Principal:

- ✓ Avaliação da infecção de megacariócitos e plaquetas pelo VHC e a influência na fisiopatologia da hepatite C.

2.2. Objetivos específicos:

- ✓ Isolamento e avaliação pós-infecção *in vitro* de megacariócito pelo VHC;
- ✓ Avaliar a possível interação do VHC com megacariócitos e plaquetas na superfície e no citoplasma celular;
- ✓ Localização do vírus VHC em megacariócitos e plaquetas;
- ✓ Análise da expressão dos receptores CD81 e Claudina-1 em megacariócitos, e plaquetas e possível relação com a infecção viral;
- ✓ Relacionar esses dados e inferir sobre o significado destes achados na fisiopatologia da hepatite C.

3. Material e Métodos

3.1. Comitê de Ética

Após aprovação do Comitê de Ética do Hospital das Clínicas de Botucatu e do Centro Coparticipante Hospital Amaral Carvalho - Jaú (Número do Parecer: 1.354.285 – Anexo A), iniciaram-se as coletas de plaquetas no Hospital das Clínicas de Botucatu e de medula óssea no serviço de transplante de medula óssea do Hospital Amaral Carvalho.

3.2. Metodologia para identificação da presença de Vírus da Hepatite C (VHC) por Citometria de Fluxo em plaquetas.

3.2.1. Infecção “*in vitro*” das plaquetas saudáveis pelo VHC

A metodologia de obtenção e infecção de plaquetas saudáveis foi baseada no protocolo descrito anteriormente por PADOVANI (2010).

3.2.2. Preparo da amostra

Para realização da infecção *in vitro* de plaquetas foram coletas 4 amostras de sangue total de doadores saudáveis (N=4) que aceitaram e consentiram e participar do estudo (Apêndice-A), utilizando o anticoagulante ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA).

3.2.3. Obtenção de plaquetas

Imediatamente após coleta, o sangue total foi centrifugado à 700 G por 3 minutos para a obtenção do plasma rico em plaquetas (PRP). Este foi transferido para microtubos de 2mL e submetido novamente à centrifugação sob rotação 1600G por 5 minutos. Retirou-se plasma remanescente e o *pellet* foi lavado 4 vezes com 1 mL de solução fisiológica 0,9% à 1500G por 5 minutos. Todas estas etapas foram realizadas à temperatura ambiente (22°±2).

3.2.4. Infecção *in vitro* das plaquetas

O *pellet* de plaquetas foi ressuspenso e homogeneizado em 1 mL plasma VHC positivo, genótipo 1, contendo 100.000 cópias de RNA/mL proveniente de pacientes com RT-PCR positivas para o VHC, armazenadas no repositório de amostras do Laboratório de Biologia Molecular do Hemocentro de Botucatu/UNESP. A amostra

ficou sob agitação contínua a 10G no *Incubator Shaker* (*New Brunswick Scientific, USA*) por 48 horas, à 37°C.

3.2.5. Imunofenotipagem em plaquetas infectadas “*in vitro*” por citometria de fluxo

Ao final das 48 horas, as plaquetas foram retiradas do *Incubator Shaker* e lavadas uma vez com solução fisiológica 0,9% seguida de segunda lavagem com PBS-EDTA-Na₂ acrescida 1% de albumina bovina (BSA), denominado de tampão plaquetário. Esta solução foi utilizada para realizar as lavagens e ressuspensões celulares com a intenção de diminuir ligações inespecíficas. Padronizou-se também que todas as lavagens utilizariam 500µL deste tampão e seriam realizadas sob rotação de 1500G por 5 minutos à temperatura ambiente.

Ao final desses processos, a concentração celular foi ajustada para 100.000 plaquetas/uL e foram realizadas as seguintes incubações:

1) Avaliação dos receptores virais do VHC

Uma alíquota de 50µL da suspensão celular foi incubada com 1µL do anticorpo monoclonal Claudina-1 conjugado com alexa fluor 488 juntamente com 0,5µL do anticorpo monoclonal CD81 conjugado com APC para quantificação dos receptores do VHC. O anticorpo monoclonal CD61 conjugado com PE foi utilizado para caracterização plaquetas e o volume utilizado foi de 0,5 µL.

A incubação foi de 30 minutos à temperatura ambiente no escuro. Transcorrido o tempo, estes foram lavados uma vez e ressuspensos em 500µl tampão de plaquetário.

2) Avaliação da presença do VHC em superfície e citoplasma celular

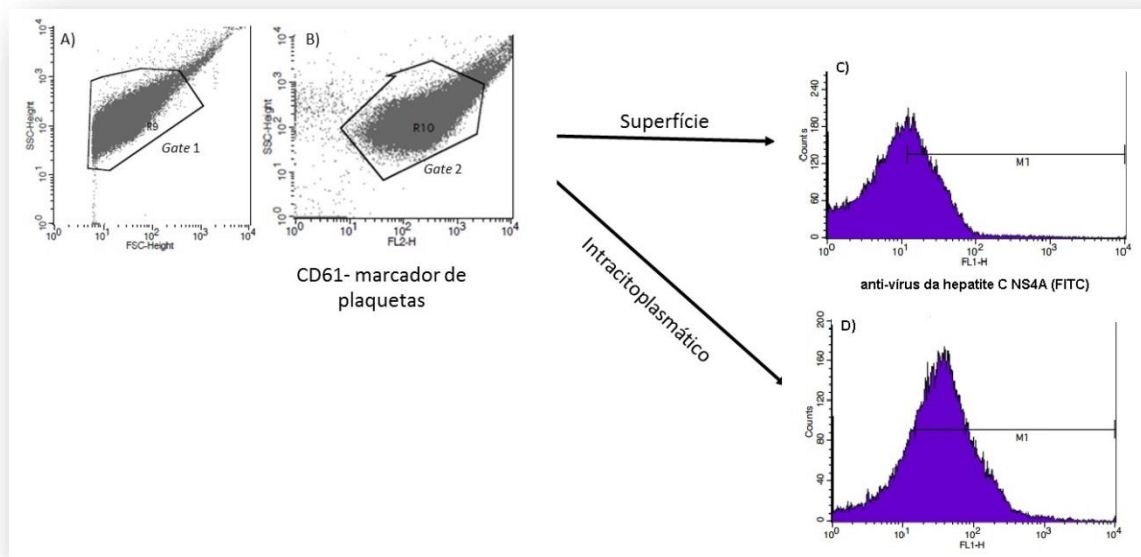
Para avaliar a presença do VHC na superfície e intracitoplasmático realizamos padronizações com diferentes concentrações do anticorpo monoclonal anti-vírus da hepatite C NS4A (FITC) (anti-NS4A-FITC) a fim de bloquear todos os epítomos virais de superfície nas plaquetas. A concentração inicial do anticorpo era de 1,4mg/mL, este foi diluído com PBS-BSA à 1% nas concentrações de 1:100, 1:200, 1:400, 1µL e 0,5µL. Verificou-se que a concentração ideal foi 0,5µL do anticorpo puro para 50µL de amostra com concentração celular de 100.000 plaquetas/uL.

Desta maneira, incubou-se 50µL plaquetas infectadas *in vitro* com 0,5µL de anticorpo monoclonal CD61 (PE) e 0,5µL anticorpo monoclonal anti-NS4A-FITC, por 30 minutos à temperatura ambiente no escuro, para verificar a presença do vírus de superfície. Após este tempo a amostra foi lavada uma vez, ressuspensa em 500µL no tampão plaquetário e adquirida no citômetro de fluxo modelo FACSCalibur-BD® .

Após a aquisição, esta mesma amostra foi submetida ao protocolo de fixação e permeabilização adaptado de COGNASSE *et al.* (2005). A fixação plaquetária foi feita utilizando 50µL de paraformaldeído à 4,2% gelado e incubado por trinta minutos à temperatura ambiente. A amostra foi lavada com 500µL de tampão plaquetário e centrifugada a 1500G por 5 minutos para retirada do excesso de reagente de fixação. Prosseguiu-se realizando a permeabilização plaquetária adicionando 50µl de Triton X-100 0,4% ao *pellet* por 5 minutos à temperatura ambiente, em seguida, a amostra foi lavada e ressuspensa em 50µL do tampão. Adicionou-se 0,5µL do anticorpo monoclonal anti-NS4A- FITC por 30 minutos à temperatura ambiente, com propósito de verificar a presença do VHC intracitoplasmático. A amostra foi lavada e ressuspensa em 500 µL de tampão plaquetário e novamente adquirida no citômetro de fluxo.

A seleção da população de interesse (denominada *gate*) foi baseada em morfologia celular e expressão de marcador fenotípico de plaquetas (CD61) (figura 8), seguida de posterior avaliação da presença do vírus.

Figura 8- Estratégia de análise de plaquetas infectadas



Delimitação da estratégia de análise de plaquetas: A) Dot Plot - SSC (granulosidade celular) vs FSC (tamanho celular), b) *gate* na população CD61+ (marcador plaquetário) e C-D) histogramas para análise de expressão de NS4A-FITC (FL1) na superfície e intracitoplasmático. Padronizou-se que as aquisições de 50.000 eventos no *gate* G1. Fonte: Material elaborado pelo autor.

Paralelamente aos testes foram realizados dois controles negativos: controle autofluorescente, ou seja, células submetidas ao mesmo processo que as demais, porém sem adição de outros componentes, a não ser, as soluções de lavagens ou de suspensão celular. E controle isotópico, que consiste no uso de anticorpo monoclonal sem especificidade com a amostra teste, do mesmo isótipo e fluorescência utilizado nos testes, cuja finalidade é quantificar e eliminar fluorescência inespecífica, evitando assim interferência de *background* (GOLIM *et al.*, 2007).

Todos os tubos utilizados para análises de plaquetas foram recobertos com 3 gotas de albumina bovina (BSA) a 5% diluído em PBS ficando sob repouso por 5 minutos à temperatura ambiente. O excesso do reagente foi removido por inversão.

3.2.6. Controles isotípicos e anticorpos monoclonais utilizados em plaquetas e megacariócitos

- ✓ Controle Isotípico FITC Mouse IgG1, κ Clone MOPC-21- BD Pharmingen™ ;
- ✓ Controle Isotípico PerCp Mouse IgG1, κ Clone MOPC-21- BD Pharmingen™;
- ✓ Controle Isotípico APC Mouse IgG1, κ Clone MOPC-21 – BD Pharmingen™;
- ✓ Anticorpo monoclonal anti-vírus da hepatite C NS4A conjugado com FITC (clone S4-13) – Abcam®;
- ✓ Anticorpo monoclonal anti-claudina-1 conjugado com Alexa Fluor 488 - Rhea®;
- ✓ Anticorpo monoclonal anti-Hu CD61 (PE) (Clone VIPL2)- EXBIO®;
- ✓ 7AAD – BD Pharmingen™;
- ✓ Anticorpo monoclonal anti-CD45 (PerCP) – BD Pharmingen™
- ✓ Anticorpo monoclonal anti-Hu CD81 (APC) (Clone M38) - EXBIO®.

3.3. Identificação e localização do VHC em plaquetas oriundas de pacientes com Hepatite C

3.3.1. Preparo e obtenção de plaquetas do sangue periférico proveniente de indivíduos com Hepatite C.

Pacientes com hepatite C crônica (N=2) *naives*, ou seja, pacientes não expostos a nenhum medicamento, foram convidados a participar da pesquisa. Após consentimento foi coletado 5mL de sangue periférico utilizando o anticoagulante EDTA. Imediatamente após a coleta a amostra foi centrifugada por 400G por 10 minutos à temperatura ambiente para a obtenção do PRP. Esta foi transferida para tubos de hemólise e centrifugada à 1500G por 5 minutos. O *pellet* foi ressuspensão em 500µL de tampão plaquetário e a concentração celular ajustada para 100.000 plaquetas/uL.

Os tubos testes foram recobertos com 3 gotas de BSA à 5% diluído em PBS. Alíquotas de 50µL da suspensão celular foram distribuídas nos tubos para verificar a expressão dos receptores virais CLDN1 e CD81 e a presença do VHC na superfície e citoplasma celular, utilizando-se mesmo protocolo descrito no item 3.2.5.

3.4. Avaliação da presença dos receptores CLDN1, CD81 e VHC em plaquetas por microscopia confocal

Amostras de plaquetas infectadas *in vitro* e de biópsia hepáticas foram utilizadas com finalidade de visualizar a expressão dos receptores CLDN1, CD81 e a presença do VHC na superfície e no citoplasma plaquetário.

As imagens foram capturadas utilizando o Microscópio Confocal de Varredura a laser TCS SP5 – Leica com auxílio do Software LAS AF versão 2.7.3.9723 localizado no Centro de Microscopia Eletrônica do Instituto de Biociências de Botucatu, UNESP.

O microscópio confocal é um equipamento composto por laser, espelho dicróico e lentes que juntamente com o pinhole direcionam os feixes de luz resultando numa imagem precisa no fotodetector, permitindo assim a criação de imagens ópticas de diferentes profundidades dentro de um tecido ou célula, possibilitando a obtenção de uma imagem 3D devido à combinação destas secções (NWANESHIUDU *et al.*, 2012).

Assim como na citometria de fluxo a microscopia confocal necessita do uso de anticorpos conjugados com fluorocromos para realizar suas análises, partindo deste princípio, incubamos plaquetas infectadas “*in vitro*” conforme descrito no item 3.2.5.

As amostras foram incubadas em tubos de citometria conforme protocolo, porém, ao invés de serem adquiridas no citômetro de fluxo, as amostras foram pingadas sob lâminas silanizadas (HDA®) e preenchidas com meio de montagem Fluoroshield™ histology mounting medium (F6182- Sigma-Aldrich®). As lâminas foram seladas com resina e ficaram à temperatura de 6°C ±2 no escuro.

As lâminas preparadas e observadas na microscopia confocal foram:

1. Plaquetas infectadas “*in vitro*” incubadas com receptores virais claudina-1 (Alexa Fluor 488), CD81 (APC) e o marcador plaquetário CD61 (PE).
2. Plaquetas não-infectadas marcadas com CD61 (PE) e CD81 (APC) a fim de verificar a presença ou ausência deste receptor.

Para demonstrar a presença e localização do VHC na superfície e intracitoplasmático em plaquetas, utilizamos fragmentos hepáticos parafinado proveniente de biópsia. Os cortes histológicos foram confeccionados pelo Laboratório

de Imunohistoquímica do Departamento de Patologia do Hospital das Clínicas de Botucatu. Os blocos parafinados contendo tecido hepático foram cortados na espessura de 0,3µm , fixados em lâminas silanizadas (HDA®) e incubados por uma hora em estufa por 65°C , a recuperação antigênica foi realizada no aparelho PT Link (Dako®). Após tal procedimento, as lâminas seguiram para o Laboratório de Imunofluorescência do Departamento de Patologia do Hospital das Clínicas de Botucatu, onde foram realizadas as marcações.

Os fragmentos hepáticos foram recobertos com avidina (Vector Laboratories®) e posteriormente com biotina (Vector Laboratories®) por 20 minutos à temperatura ambiente, a fim de bloquear sítios de ligação inespecíficos. As lâminas foram lavadas com PBS e incubadas com o anticorpo monoclonal anti-CD61 diluído 50 vezes no diluente EnVision™ FLEX ANTIBODY DILUENT (Dako) ficando incubado por 2 horas à temperatura ambiente. Transcorrido este tempo as amostras foram lavadas e incubadas *overnight* com anticorpo monoclonal anti-hepatite C NS4A diluído 20 vezes no diluente EnVision™ FLEX ANTIBODY DILUENT (Dako) sendo armazenada em geladeira e protegido da luz. Decorrido o tempo de incubação os cortes histológicos foram lavados com PBS e finalizados com meio de montagem Fluoroshield™ histology mounting medium (Sigma-Aldrich®) ficaram armazenadas à 6°C ±2 até o momento de leitura no microscópio confocal.

3.5. Metodologia para identificação da presença de Vírus da Hepatite C (VHC) por Citometria de Fluxo em megacariócito

A técnica de coleta e obtenção de megacariócito a partir de amostras de medula óssea proveniente de punção da crista ilíaca foi baseada em IKOMA (2001). Por sua vez o protocolo de infecção de megacariócitos pelo VHC foi inicialmente baseado em PADOVANI (2010) necessitando de modificações devido às características singulares de plaquetas e megacariócitos.

3.5.1. Coleta e obtenção dos megacariócitos

As coletas foram realizadas no serviço de transplante de medula óssea do Hospital Amaral Carvalho - Jaú. Foram coletadas ao todo 7 amostras medulas ósseas (MOs) de doadores voluntários e que consentiram participar da pesquisa (Apêndice-B). Cada amostra era composta de 4 mL de medula para 1 mL do anticoagulante

CPDA-1 modificado, o material foi coletado por punção da crista íliaca realizado por profissionais habilitados. Após procedimento, a amostra foi transportada sob refrigeração ($6,0^{\circ}\text{C} \pm 2$) para serem processadas nos Laboratórios de Biologia Molecular e Citometria de Fluxo-Hemocentro de Botucatu.

3.5.2. Isolamento de megacariócito da medula óssea

As amostras de MO foram processadas em fluxo laminar para garantir a esterilidade da amostra, o material coletado foi diluído no tampão de MK (*megakaryocyte buffer*) na proporção de 1:1, sendo posteriormente filtrado em *nylon* monofilamento de $160\mu\text{m}$ estéril (Figura 9).

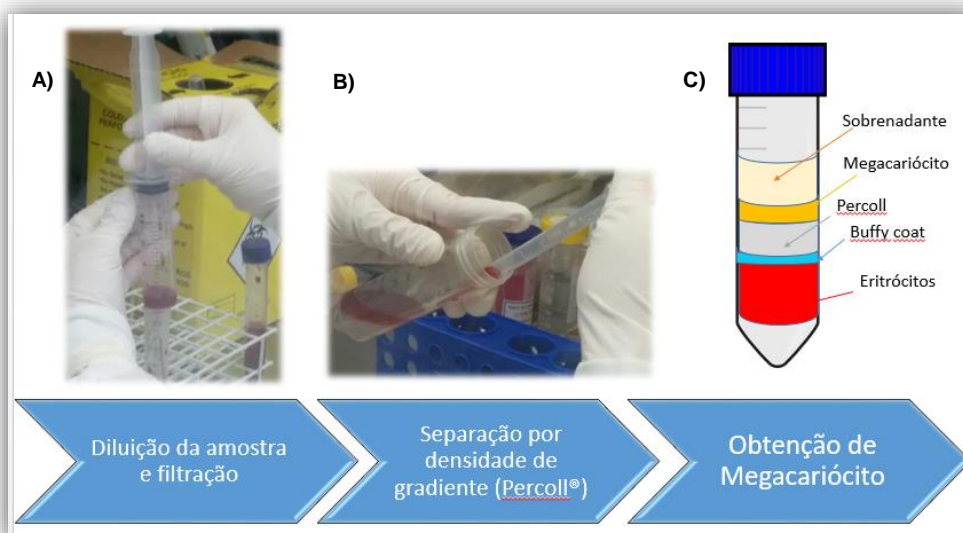
A obtenção dos megacariócitos, foi realizada por fracionamento descontínuo de densidade utilizando Percoll[®] (P1644 - Sigma-Aldrich[®]) na densidade 1.055 g/mL (ISHIBASHI *et al.*, 1986; TOMER *et al.*, 1989). A suspensão celular foi adicionada sob o Percoll[®] delicadamente em proporções equivalentes (1:1) sendo centrifugado à 405G por 20 minutos à 20°C .

Após centrifugação, coletou-se as células da camada acima do Percoll e toda a parte superior, estas foram imediatamente lavadas com 2 volumes de tampão MK gelado e submetidas novamente à centrifugação à 405G por 10 minutos à 4°C para retirar o percoll remanescente (Figura 9). O sobrenadante foi aspirado e o pellet ressuspenso em 1 mL de meio cultura RPMI 1640 completo com L-Glutamina acrescido de 1% de antibiótico e antimicótico (Atb/Atc) (Gibco[®]).

A contagem celular foi realizada na câmara de Neubauer utilizando solução de Turk, para tanto, separou-se $50\mu\text{L}$ da suspensão celular e adicionou-se 1 mL de solução de Turk, aguardou-se 10 minutos e contou-se os quatro quadrantes laterais externos. A soma dos valores foi multiplicada por 50, ajustando a concentração celular para $4,0 \times 10^6$ células/mL.

Células remanescentes foram congeladas com soro fetal bovino (Sigma - Aldrich[®]) acrescida de 10% de dimetilsulfóxido- DMSO (Sigma-Aldrich[®]) na temperatura de -80°C .

Figura 9- Preparo e obtenção dos megacariócitos.



Isolamento de megacariócitos - três fases principais: A) remover espículas ósseas e gordura; B) fracionar amostra em camadas celulares utilizando diferença de densidade de gradiente; C) separação e obtenção da população megacariocítica. Fonte: material elaborado pelo autor.

3.5.3. Padronização da Infecção “*in vitro*” do megacariócito.

Para a realização da infecção “*in vitro*” de megacariócitos foram necessárias modificações no protocolo de PADOVANI (2010) devido às diferenças morfológicas entre megacariócitos e plaquetas. Desta forma, padronizações de cultura celular a fim de verificar a viabilidade foram realizadas com células mononucleares do sangue periférico (do inglês PBMC - *Peripheral Blood Mononuclear Cells*) por apresentarem algumas características estruturais semelhantes a megacariócitos como presença de núcleo, tamanho maior que a plaqueta e por serem obtidas também por diferença de gradiente de densidade. Para este ensaio preservamos o uso de medula.

Amostras de sangue total (20 mL) foram coletadas com heparina e submetidas à centrifugação numa rotação de 120G por 5 minutos para separação do PRP. Esta porção foi homogeneizada com meio RPMI 1640 completo com L-Glutamina (Gibco®), submetida ao processo de fracionamento celular utilizando Ficoll Paque-PLUS (GE HealthCare®) na proporção de 1:1 e centrifugada à 400g por 10 minutos. Posteriormente, coletou-se o halo celular acima do Ficoll, onde se depositam as

PBMCs, estas foram lavadas com meio RPMI 1640 completo e distribuídas em tubos cônicos de 15 mL.

Para cada tempo (24, 36 e 48 horas) foram preparados quatro tubos contendo $1,0 \times 10^5$ células/mL com 3 mL de meio de cultura RPMI 1640 completo com L-Glutamina e 1% de Atb/Atc (Gibco®). Adicionou-se em dois tubos 1 mL de plasma VHC positivo com cerca de 100.000 cópias de RNA viral/mL, genótipo 1, proveniente de pacientes com RT-PCR positivas para o VHC, armazenadas no repositório de amostras do Laboratório de Biologia Molecular do Hemocentro de Botucatu/UNESP. Uma alíquota foi encaminhada para estufa de cultura celular sob atmosfera de 37°C, 5% de CO₂ e a outra para o *Incubator Shaker* (New Brunswick Scientific, USA) sob temperatura de 37°C. O mesmo foi realizado para amostras incubadas com plasma negativo, ou seja, com sorologia negativa para VHC e demais doenças do sangue (quadro1).

Quadro 1- Avaliação da Viabilidade Celular de PBMCs.

PBMC Plasma	24 Horas	36 Horas	48 Horas
	Forma de cultivo celular	Forma de cultivo celular	Forma de cultivo celular
PMBC + Plasma VHC positivo	Estufa de cultura celular	Estufa de cultura celular	Estufa de cultura celular
	<i>Incubator Shaker</i>	<i>Incubator Shaker</i>	<i>Incubator Shaker</i>
PMBC + Plasma VHC negativo	Estufa de cultura celular	Estufa de cultura celular	Estufa de cultura celular
	<i>Incubator Shaker</i>	<i>Incubator Shaker</i>	<i>Incubator Shaker</i>

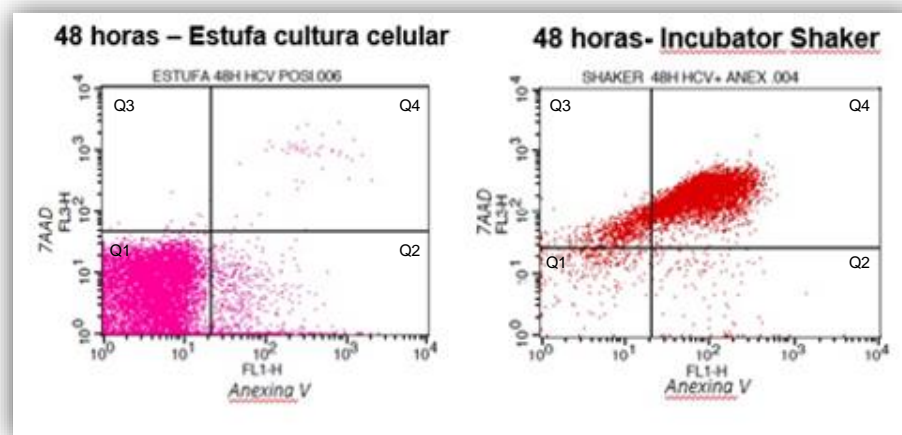
Decorrido o tempo de cada incubação, as amostras positivas e negativas, oriundas tanto da estufa como do *Incubator Shaker*, foram centrifugadas à 400G por 10 minutos à 20°C, o *pellet* foi ressuspensão em 1 mL de solução fisiológica 0,9%, submetido novamente ao processo de centrifugação, a fim de retirar os vírus remanescentes, e ressuspensão 500 µl de solução isotônica.

A avaliação da viabilidade celular foi realizada conforme protocolo sugerido pelo Kit de Detecção de Apoptose Anexina V – FITC (BD Pharmingen™) e o corante celular 7-Amino-Actinomycin D (7-AAD) (BD Pharmingen™).

3.5.4. Infecção *in vitro* dos megacariócitos pelo VHC.

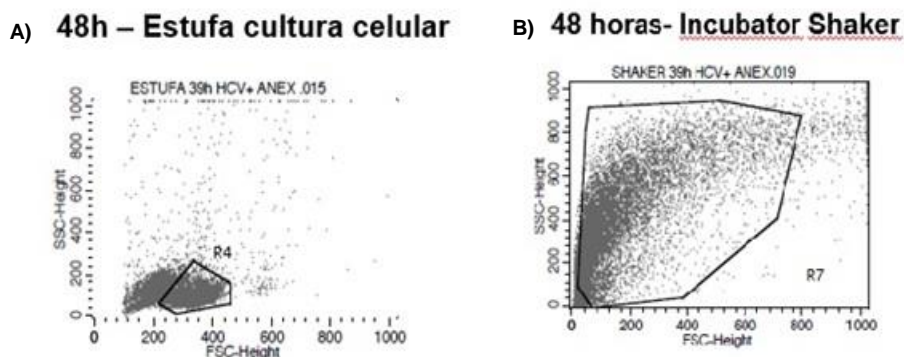
Baseado no teste anterior verificou que a melhor forma de realização da infecção *in vitro* era utilizando a estufa de cultura celular a 37°C sob atmosfera de 5% CO₂. Além disso, após as 48 horas de incubação na estufa as PBMCs apresentaram viabilidade celular de 93,23%, morte celular precoce de 6,74% e não apresentaram mudanças bruscas na sua morfologia. Em contrapartida, observamos que as amostras submetidas no *Incubator Shaker* sofreram alterações morfológicas e apresentaram morte celular de 97%, conforme pode ser verificado nas figuras 10 e 11.

Figura 10- Viabilidade Celular (PBMCs) utilizando Anexina V e 7AAD.



Análise de viabilidade celular com Anexina V-FITC/7AAD. Q1: Anex⁻/7AAD⁻: células viáveis; Q2: Anex⁺/7AAD⁻: células processo inicial de apoptose; Q3: Anex⁻/7AAD⁺ e Q4: Anex⁺/7AAD⁺: ambos quadrantes representam células em estágio avançado de morte celular. Fonte: Material elaborado pelo autor.

Figura 11- Morfologia Celular das PBMCs submetidas a diferentes métodos de cultura por 48 horas.



As figuras demonstram as características de tamanho celular (FSC) e complexidade interna (SSC) de PBMC mantidos em cultura de 48 horas. A) Estufa de cultura celular a 37°C sob atmosfera de 5% CO₂; B) *Incubator Shaker* sob temperatura de 37°C e agitação de 10G Fonte: Material elaborado pelo autor.

Portanto, padronizou-se que as infecções *in vitro* de megacariócitos seriam realizadas em estufa de cultura celular sob as mesmas condições de concentração de CO₂ e temperatura utilizado no ensaio com PBMCs.

Sendo assim, após a obtenção e contagem dos megacariócitos uma alíquota contendo 4x10⁶ células foi incubada com 6mL de meio de cultura RPMI 1640 com 1% de ATC/ATB e 6mL de plasma VHC+ contendo 100.000 cópias de RNA viral/mL. O tempo médio de cultura celular foi de 36 a 40 horas, com homogeneizações 3 vezes ao dia, a fim de favorecer o contato MK-VHC. Outra alíquota com as mesmas proporções de celulares e de meio de cultura foi incubada com plasma VHC negativo e submetido ao mesmo procedimento descrito anteriormente, servindo como um controle.

3.5.5. Imunofenotipagem em megacariócitos infectadas “*in vitro*” por citometria de fluxo

Transcorrido o tempo de incubação preconizado as amostras foram retiradas da estufa celular e centrifugadas a 400G por 10 minutos à 22°C. O *pellet* foi lavado uma vez com solução fisiológica 0,9% e ressuspenso em 1mL de tampão MK. Tubos previamente identificados receberam o volume de 100µL desta amostra.

Os megacariócitos foram marcados com anticorpos monoclonais conjugados com fluorocromos, conforme descrição abaixo:

Tubo 1 - Avaliação dos Receptores Membranares de megacariócitos incubados com plasma VHC positivo e negativo

Incubou-se 100µL de suspensão celular com 1µL anti-CD61(PE) e 3µL anti-CD45 (PerCP), com a intenção de identificar a população megacariocítica. Ademais, adicionou-se anti-claudina 1 (Alexa Fluor 488) e anti-CD81 (APC). Incubou-se por 30 minutos à temperatura ambiente e em seguida foi submetido ao processo de lavagem.

Padronizou-se que todas as lavagens seriam realizadas 400G por 10 minutos utilizando 500 µL de tampão MK. O sobrenadante foi desprezado e o *pellet* ressuspense em 500 µL de tampão MK.

Tubo 02 - Localização do VHC em megacariócitos infectados *in vitro*

Para verificar a presença e localização do VHC em megacariócitos infectados *in vitro*, 100µL da suspensão celular foi incubada com 1µL do anti-CD61 (PE) e 1µL do anti-NS4A-FITC por 30 minutos. A finalidade desta primeira incubação foi avaliar a expressão de vírus na superfície celular e, por saturação, bloquear os epítomos virais de superfície em megacariócitos, a fim de posteriormente permeabilizá-los para marcar os avaliar a expressão de vírus no interior celular. A amostra ficou incubada 30 minutos à temperatura ambiente no escuro. Após este tempo a amostra foi lavada uma vez e ressuspensa em 500µL no tampão MK.

A amostra foi adquirida no citômetro de fluxo modelo FACSCalibur-BD® utilizando o software CellQuest™ em tela de aquisição previamente padronizada.

Após a aquisição, esta mesma amostra foi submetida ao protocolo de fixação e permeabilização adaptado de COGNASSE, *et al.* (2005). A fixação e permeabilização foi a mesma utilizada para plaquetas (item 3.2.5), porém as amostras foram lavadas e ressuspensas em tampão MK.

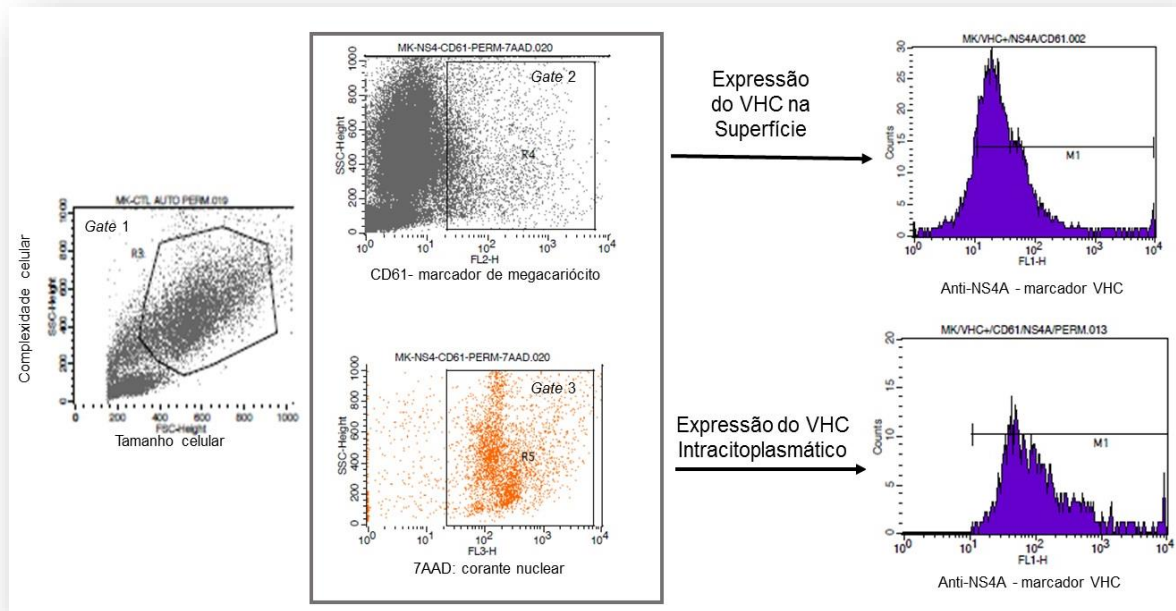
Feita a permeabilização, adicionou-se 1uL do anticorpo anti-NS4A- FITC por 30 minutos à temperatura ambiente, com propósito de verificar a presença do VHC intracitoplasmático, e mais 15 minutos com corante nuclear 7AAD, utilizado para auxiliar na fenotipagem da linhagem megacariocítica. Para este ensaio foram

considerados megacariócitos aquelas células que expressavam CD61⁺ na superfície e após permeabilização, co-expressavam CD61⁺/7AAD⁺.

Ao final da incubação a amostra foi lavada e ressuspensa em 500µL de tampão MK e adquirida novamente em citômetro de fluxo.

Concomitantes aos testes foram realizados dois controles negativos, autofluorescente e controles isotípicos. Todos os tubos foram adquiridos no citômetro de fluxo modelo FACSCalibur-BD utilizando software CellQuest™.

Figura 12- Estratégia de análise de megacariócitos.



Parâmetros para delineamento da estratégia de análise de megacariócitos: Dot Plot - SSC (granulosidade celular) vs FSC (tamanho celular), *gate* na população CD61⁺ (FL2), *gate* na população 7-AAD⁺, foi utilizada equação para somatória dos *gates*, então seguiu-se à análise de expressão de NS4A-FITC (FL1) em histograma. Fonte: material elaborado pelo autor.

Para as análises dos receptores CLDN1 e CD81 em megacariócitos utilizou o mesmo delineamento de estratégia de análise, porém o corante nuclear 7AAD foi substituído pelo anticorpo anti-CD45 (PerCp), sendo os marcadores anti-CLDN1-Alexa 488 e anti-CD81-APC.

3.5.6. Microscopia confocal de Megacariócitos

Análises dos receptores CLDN1 e CD81 foram realizadas em megacariócitos incubados com plasma negativo e positivo para VHC. O protocolo de marcação foi o mesmo utilizado para a citometria de fluxo, porém, ao invés de serem adquiridas no citômetro as amostras foram gotejadas sob lâminas silanizadas (HDA[®]) e preenchidas com meio de montagem Fluoroshield[™].

A presença do VHC em megacariócitos infectados *in vitro* também foi feita de acordo com item 3.5.5, porém, a permeabilização dos megacariócitos foi feita utilizando saponina 0,2%. Ao final do teste a amostra foi pingada sob a lâmina silanizada e adicionado o meio de montagem Fluoroshield[™].

As imagens foram capturadas utilizando o Microscópio Confocal de Varredura a laser TCS SP5 – Leica com auxílio do Software LAS AF versão 2.7.3.9723 localizado no Centro de Microscopia Eletrônica do Instituto de Biociências de Botucatu, UNESP.

4. Resultado e Discussão

4.1. Plaquetas

4.1.1. Avaliação da infecção pelo VHC em plaquetas por citometria de fluxo e microscopia confocal

Amostras das quatro plaquetas infectadas *in vitro*, ou seja, plaquetas provenientes de doadores saudáveis incubadas com plasma VHC positivo foram analisadas por citometria de fluxo após as 48 horas de incubação.

Para verificar a presença ou ausência dos VHC na superfície e no interior de plaquetas estabeleceu-se a seguinte dinâmica: amostras infectadas *in vitro* foram marcadas com receptor específico de plaqueta anti-CD61 (PE), utilizado para caracterização destas células, e anticorpo monoclonal direcionado a proteína viral NS4A (FITC) para verificar a presença do VHC de superfície nestas células. Após a aquisição no citômetro de fluxo, este mesmo tubo foi submetido ao processo de fixação e permeabilização seguido de segunda incubação com anti-NS4A (FITC), a fim de atingir os epítomos virais intracitoplasmáticos, e adquirido novamente no citômetro para verificar a presença do vírus no interior destas células.

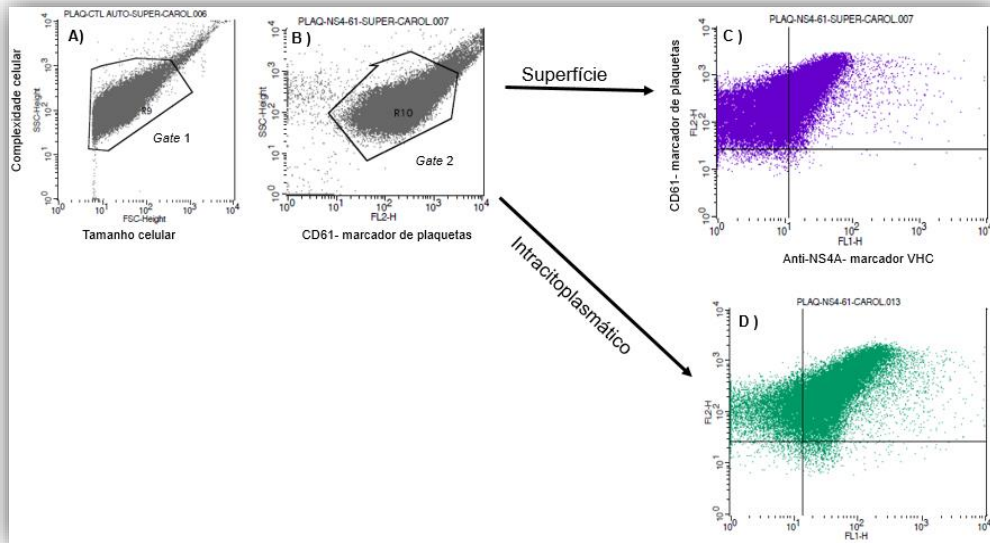
Foi estabelecido um índice, baseado na metodologia praticada em provas de compatibilidade de transplante por citometria de fluxo, denominado *crossmatch* ou prova cruzada, no qual utiliza-se a média da intensidade de fluorescência (MIF) para verificar a compatibilidade entre doador e receptor. Nosso objetivo, neste caso, foi avaliar se havia equivalência ou aumento da MIF da expressão de vírus intracitoplasmático quando comparada à expressão de superfície. Para tanto, obtivemos primeiro o valor da MIF de superfície do anti-NS4A (FITC), denominado de valor basal. Após a segunda incubação e aquisição no citômetro, obtivemos a MIF intracitoplasmática. O quociente do valor da MIF intracitoplasmática dividido pelo valor basal representa o aumento em número de vezes (quadro 2).

Quadro 2 - Valores percentuais e MIF da expressão de VHC na superfície e intracitoplasmático em plaquetas.

Doador	% NS4A de superfície	MIF NS4A de superfície (valor basal)	% NS4A intracelular	MIF NS4A intracelular	Índice (Taxa de MIF intra/MIF basal)
Doador 1	69,08%	15,12	63,85%	32,2	2,13 vezes
Doador 2	41,68%	21,29	77,41%	42,55	2 vezes
Doador 3	48,82%	20,17	68,73%	35,23	1,75 vezes
Doador 4	37,33%	16,7	86,43%	53,28	3,20 vezes
Média	49,23%	18,32	74,11%	40,82	2,27 vezes

Na análise de plaquetas, verificamos que a média de expressão de VHC na superfície de plaquetas (entre os indivíduos) foi de 49,23%, com média de intensidade de fluorescência de 18,32 (valor absoluto), enquanto que a média de expressão intracelular do vírus foi de 74,11%, com MIF de 40,81. Este aumento de expressão e da MIF do VHC intracitoplasmático está representado na fig.13, devido ao deslocamento da intensidade de fluorescência no eixo X, referente à expressão do vírus.

Figura 13 - Expressão viral em plaquetas.



A) Seleção de plaquetas por características morfológicas; B) População CD61+; C) Expressão viral na superfície celular; D) Expressão viral intracitoplasmática. Fonte: material elaborado pelo autor.

Amostra de sangue periférico de dois pacientes portadores de hepatite C *naïve*, ou seja, virgens de tratamento para hepatite C, que consentiram participar do estudo, foram analisadas da mesma maneira com o objetivo de avaliar se o mesmo fenômeno verificado *in vitro* era reproduzido em plaquetas circulantes de pacientes com hepatite C, neste caso denominado de plaquetas infectadas *in vivo*. Os resultados estão demonstrados no quadro 3.

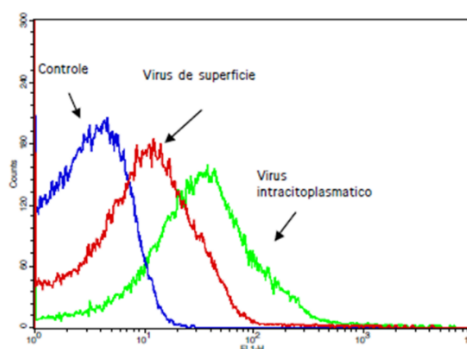
Quadro 3- Valores percentuais e MIF da expressão de VHC na superfície e intracitoplasmático em plaquetas infectadas *in vivo*.

Paciente	Genótipo VHC	Carga Viral Plasmática (cópias/log)	% NS4A superfície	MIF NS4A superfície	% NS4A intracelular	MIF NS4A intracelular	Índice (Taxa de MIF intra/MIF basal)
Paciente 1	3	17.051 (4.23)	8,74%	186,01	20,89%	83787,88	450 vezes
Paciente 2	1b	3.243.950 (6.51)	64,64%	40,68	91,66%	19445,64	478 vezes

Diferentemente da infecção *in vitro*, na qual a carga viral utilizada para infecção das plaquetas foi controlada (100.000 cópias de RNA/mL), na infecção *in vivo* observou-se que o paciente 1 apresentou maior MIF quando comparado com o paciente 2, apesar dos valores percentuais terem sido maiores no paciente genótipo

1, contudo o valor do índice foi semelhante entre si independente da carga viral. Analisando os dados de cada paciente individualmente observa-se que o mesmo comportamento encontrado *in vitro* é reproduzido *in vivo*, no qual, verifica-se a presença de vírus na superfície e intracitoplasmático e aumento nos valores percentuais e da MIF na análise intracelular, desta forma podemos afirmar a presença do vírus da hepatite C tanto na superfície como no interior de plaquetas. Gráficos de sobreposições foram plotados utilizando o software *CellQuest™* (gráfico 1), para representar o fenômeno observado tanto *in vitro* quanto *in vivo*.

Gráfico 1- Expressão de VHC em plaquetas infectadas *in vitro*



Histogramas representando a expressão de VHC em plaquetas (Azul: CTL negativo, Vermelho: VHC em superfície e Verde: VHC intracitoplasmático). Fonte: Material elaborado pelo autor.

A presença do VHC em plaquetas foi relatada por Padovani (2010) e Hamaia *et al.* (2001) os quais verificaram por análises moleculares a existência de RNA viral, em plaquetas infectadas *in vitro* e *in vivo*, respectivamente. Assim os nossos achados corroboram com os trabalhos destes autores.

Ariede *et al.* (2015), verificou que as taxas de RNA viral no plasma e em plaquetas de pacientes VHC+, cultivadas por 144 horas, apresentaram diminuição na concentração viral plasmática, enquanto que os níveis de RNA em plaquetas se mantiveram conservados, apontando que o VHC pode perdura por longos períodos no organismo quando associado às plaquetas, podendo ser considerado reservatório viral.

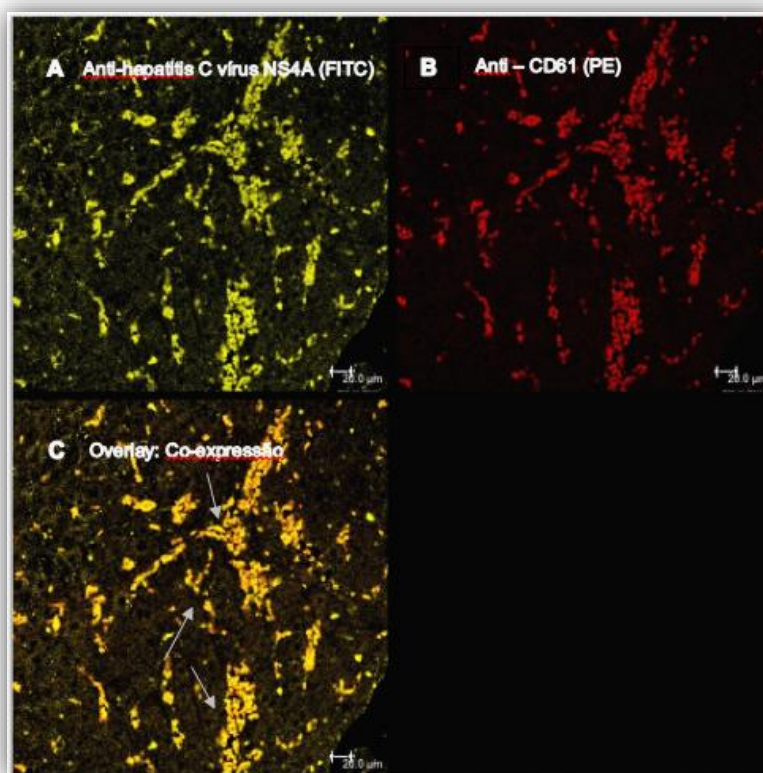
Além disso, relatos na literatura mostram que uma das vantagens do VHC estar associado às plaquetas é que desta forma anticorpos neutralizantes não conseguem atuar sob as partículas virais, contribuindo assim, para a persistência viral devido a falhas de atuação do sistema imune ou do medicamento, podendo ser uma

das causas de recidivas da doença (ALMEIDA *et al.*, 2009; WITTEVELDT *et al.*, 2009; VASURI *et al.*, 2014; Ariede *et al.*, 2015).

Para contraprovar os resultados obtidos por citometria de fluxo, utilizamos a microscopia confocal de modo que pudéssemos registrar imagens da expressão viral e de moléculas envolvidas na infecção celular.

Preparamos lâminas provenientes de biopsia hepática, coradas com anticorpos monoclonais conjugados com fluorocromos utilizando anti-CD61 (PE) e anti-NS4A (FITC) para confirmar a presença do VHC na superfície e interior de plaquetas por microscopia confocal, sendo avaliado simultaneamente a co-expressão destes marcadores, conforme pode ser observado figura 14, 15 e 16.

Figura 14- Expressão de plaquetas (CD61⁺) e VHC (anti-NS4A) em tecido hepático.



A) Expressão do VHC no tecido hepático com regiões de maior fluorescência. B) Presença de plaquetas (vermelho) no interior do tecido hepático (CD61⁺) C) Sobreposição das figuras A e B, demonstrando a presença do VHC em plaquetas. Fonte: material elaborado pelo autor.

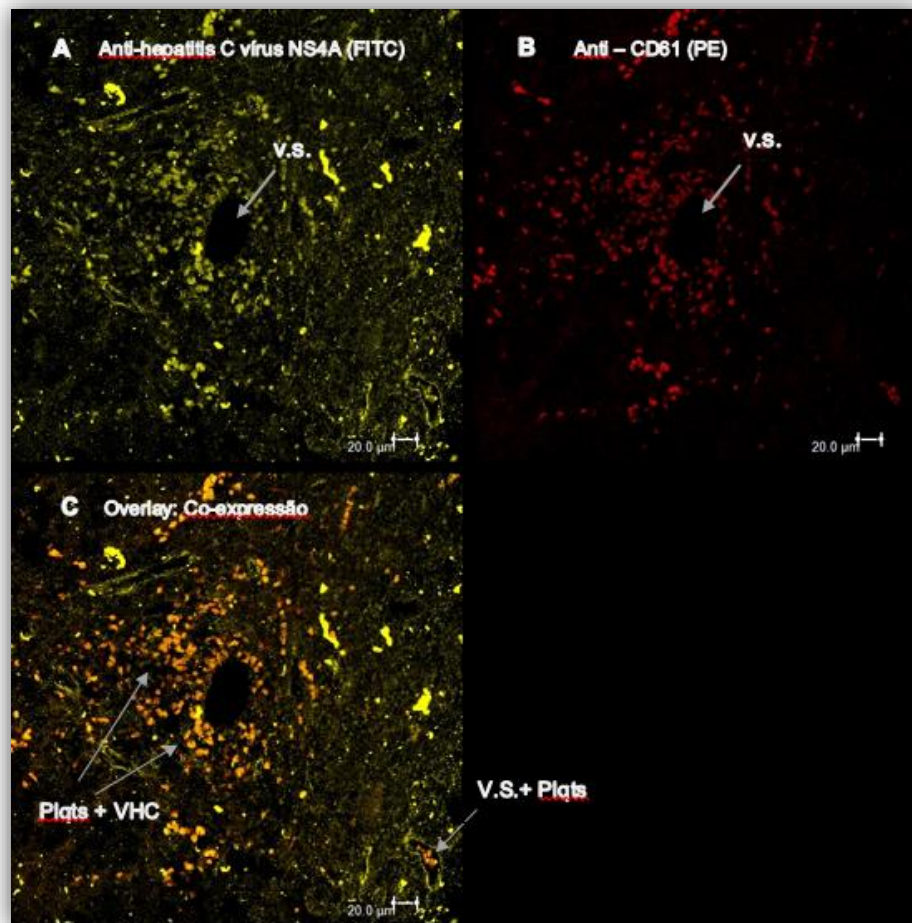
As análises das imagens foram realizadas com recursos do software LAS AF, versão 2.7.3.9723. Padronizou-se a utilização de cor vermelha para representar as

células que expressassem o receptor CD61⁺ (PE), o VHC (FITC) pela cor amarela e a co-expressão destes dois marcadores resultando em tom laranja.

Desta forma, pode-se verificar a presença do vírus da hepatite C no tecido hepático (fig. 14-A), havendo áreas onde com maior intensidade de fluorescência (FITC). A figura 14-B, representa as plaquetas coradas com anti-CD61(PE). Na sobreposição de imagens os pontos de maior fluorescência em 14-A coincidem com as áreas preenchidas por plaquetas, desta forma, a imagem 14-C representa co-expressão de ambos os marcadores, indicando a presença de VHC nas plaquetas.

Na figura 15 pode-se observar acúmulo de plaquetas ao redor do vaso sanguíneo, havendo co-expressão entre CD61 e NS4A nestas células. Os capilares ou vasos presentes no endotélio hepático desempenham papel central na troca de macromoléculas, solutos e fluidos provenientes do sangue, sendo também porta de entrada de patógenos neste órgão. Para estabelecer persistente infecção dos hepatócitos, VHC transfere da corrente sanguínea para o endotélio, vírus circulantes, os quais são capturados pelas células de Kupffer e células dendríticas (DCs), que os transportam até a região basal dos hepatócitos promovendo contato do vírus com os receptores SRB-1, CD81, CLDN1 e OCLD favorecendo internalização viral (BARTOSCH e DUBUISSON 2010; ZHU *et al.*, 2014). Baseado neste fato observado *in vivo*, consideramos a possibilidade de plaquetas infectadas presentes na corrente sanguínea facilitarem o contato do vírus com o receptor, desempenhando o papel semelhante às células de Kupffer ou DCs.

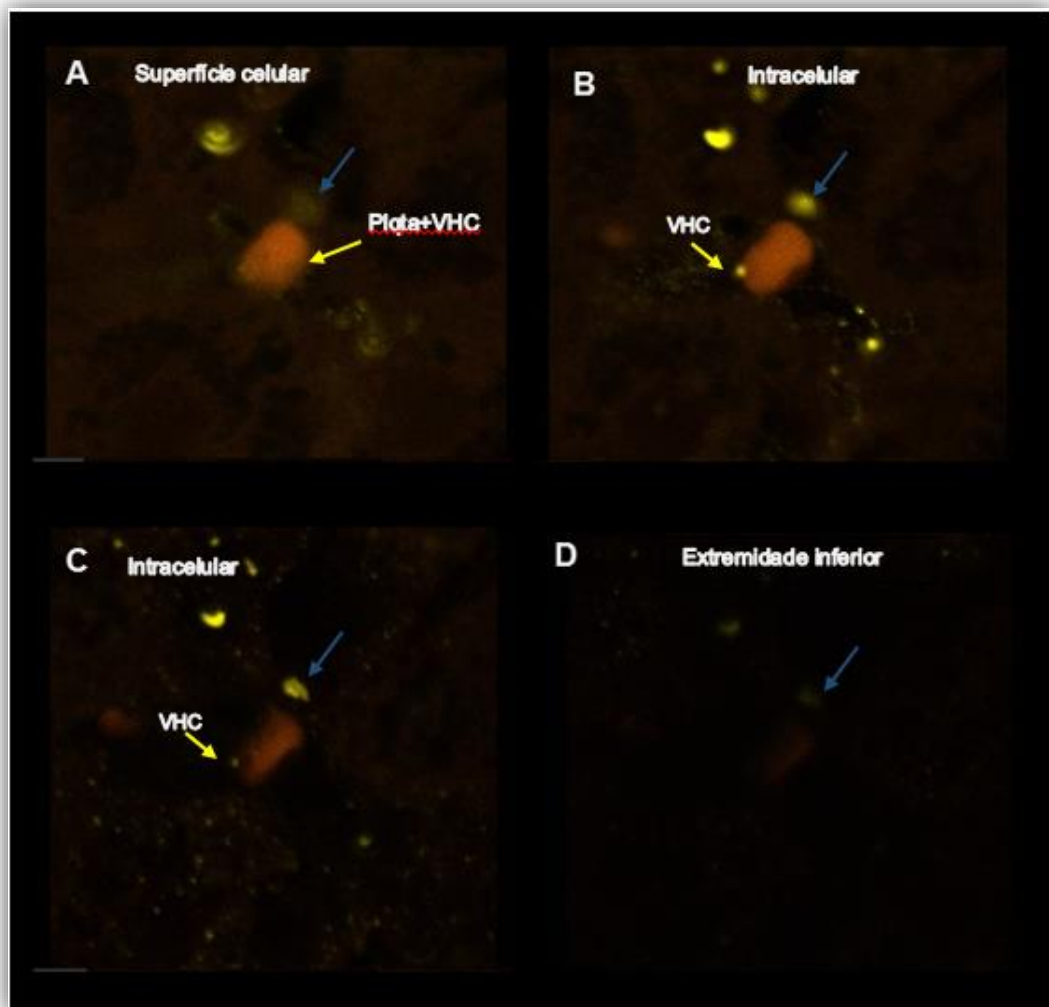
Figura 15- Expressão de plaquetas (CD61+) e VHC (anti-NS4A) em tecido hepático evidenciando o acúmulo no entorno de um vaso sanguíneo.



Plqts: plaquetas; V.S. – Vaso sanguíneo; VHC: vírus da hepatite C. Fonte: material elaborado pelo autor.

A microscopia confocal permite capturar imagens em diferentes níveis de profundidade, assim, a figura 16 mostra quatro diferentes camadas onde podemos verificar a presença do VHC na superfície de plaquetas (fig 16-A), seguido das figuras 16-B e 16-C que representam camadas mais internas. As setas em amarelo representam a localização viral, enquanto que as de cor azul são pontos de referência para demonstrar a profundidade do corte, indicando os diferentes níveis de análise celular.

Figura 16- Microscopia confocal de corte histológico hepático de paciente VHC+.



Identificação de plaquetas (CD61-PE) e expressão viral (NS4A-FITC), representando a expressão dos marcadores em diferentes profundidades (camadas) em plaquetas infectadas. Fonte: material elaborado pelo autor.

Em vista das imagens obtidas é possível sustentar que o vírus da hepatite C está presente tanto na superfície como no citoplasma de plaquetas e em concordância com os dados demonstrados pelas análises de citometria de fluxo.

A metodologia empregada neste estudo não nos permite descrever o mecanismo de interação do vírus com plaquetas, porém autores como Hamaia *et al.* (2001) apontam que a presença do VHC em plaquetas é devido a morfologia celular que favorece a adsorção do vírus. Todavia, autores como Verdichio-Moraes *et al.* (2009) e Padovani (2010), relatam que estas interações podem estar associadas aos antígenos plaquetários, como HPA-5b e HPA-1b, devido às alterações na frequência

destes antígenos em plaquetas de pacientes com hepatite C quando comparada à frequência em indivíduos saudáveis.

Outra via de interação poderia ser através da glicoproteína VI (GPVI) conforme relatado por Zahn *et al.* (2006). Este receptor é uma glicoproteína de membrana do tipo 1, com peso molecular de 60kDa, pertencente a superfamília das imunoglobulinas (Ig) e possui dois domínios Ig-C2, é expressa na superfície membranar de plaquetas e megacariócitos. Devido a característica deste receptor, este estudo reporta que moléculas de IgG associadas ao vírus da hepatite C poderiam se ligar ao domínio Ig-C2, promovendo uma interação entre estas células e o vírus, contribuindo para a disseminação e persistência viral.

Estudos sobre a interação de plaquetas e a hepatite C são necessários, visto que, não se sabe ao certo o mecanismo de entrada do vírus nestas células, pois plaquetas não expressam os principais receptores da infecção direta CD81, SR-B1, LDL-R e L-SIGN (ALTER, 2001; PADOVANI, 2010; ZAHN *et al.*, 2006). No entanto, conforme será relatado à frente, o receptor claudina-1 está presente em plaquetas como encontrado neste estudo, podendo ser uma via de interação o VHC.

4.1.2. Avaliação da presença e ausência dos receptores virais em plaquetas

A avaliação dos receptores do VHC em plaquetas foi realizada por citometria de fluxo e microscopia confocal. Em ambas as técnicas utilizaram-se anticorpos monoclonais conjugados com fluorocromos, conforme descrição:

- 1) Plaquetas infectadas "*in vitro*" marcadas com receptores virais anti-claudina-1 (Alexa Fluor 488), anti-CD81 (APC) e marcador plaquetário anti-CD61 (PE).
- 2) Plaquetas não-infectadas marcadas com anti-CD61 (PE) e anti-CD81 (APC).

As incubações foram realizadas conforme descrito no item 3.2.5, para a citometria de fluxo e 3.4, para microscopia confocal. A eleição dos receptores claudina-1 e CD81 foi devido a relatos na literatura que apontam estes receptores como os principais envolvidos na entrada do VHC em hepatócitos.

A avaliação da expressão de claudina-1 em plaquetas foi realizada antes e após a infecção *in vitro*. Os valores obtidos estão representados na tabela 1 e 2 respectivamente.

Tabela 1 - Expressão de CLDN1 em plaquetas pré-infecção (valor basal).

Doador	% CLDN1 de superfície	MIF CLDN1 de superfície	MIF CLDN1 intracitoplasmática	MIF CLDN1 intracelular
Doador 1	81,64%	36,16	NR	NR
Doador 2	55,52%	26,9	NR	NR
Doador 3	77,32%	43,71	NR	NR
Doador 4	69,1%	25,95	NR	NR
Média	70,90%	33,18	-	-

Legenda: NR: não realizado

Tabela 2 - Expressão de CLDN1 em plaquetas pós-infecção *in vitro* com plasma VHC positivo.

Doador	% CLDN1 de superfície	MIF CLDN1 de superfície	MIF CLDN1 intracitoplasmática	MIF CLDN1 intracelular
Doador 1	57,89%	18,43	48,17%	31,06
Doador 2	37,08%	13,7	48,88%	25,48
Doador 3	39,57%	14,99	32,62%	32,49
Doador 4	54,10%	23,5	72,57%	69,78
Média	47,16%	17,65	50,56%	39,70

A média da expressão de CLDN1 em plaquetas não infectadas foi de 70,90% com MIF de 33,18 (valor absoluto). Em contrapartida, plaquetas infectadas *in vitro*, tiveram média de expressão de CLDN1 de superfície de 47,16% e MIF de 17,65. Nota-se que após o processo de infecção houve diminuição da expressão de claudina-1 na superfície plaquetária, o que nos fez questionar sobre a possibilidade deste receptor estar sendo internalizado juntamente com o vírus por meio do processo de endocitose.

O processo de endocitose consiste na internalização do vírus juntamente com o complexo CD81-CLDN1 para o interior celular, dependente de pH ácido, sucedendo assim as etapas de replicação, formação e liberação de novos vírus.

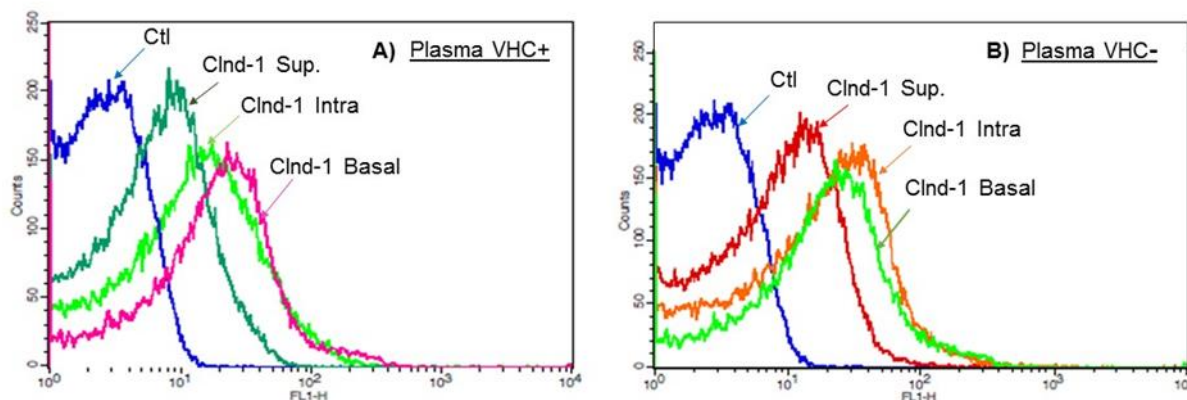
Assim, após avaliar a expressão de CLDN1 na superfície celular, saturando os epítomos antigênicos de CLDN1, procedeu-se à fixação e permeabilização, com

subsequente marcação de CLDN1 intracitoplasmática. Após aquisição e análise obtivemos média de expressão de CLDN1-intracitoplasmática de 50,60% e MIF de 39,70, demonstrando a existência desta proteína de junção no interior de plaquetas, corroborando com a possibilidade de internalização.

Portanto, na tentativa de confirmar esta hipótese, delineamos um ensaio nas mesmas condições experimentais da infecção de plaquetas, porém incubadas com plasma VHC negativo e surpreendentemente, observamos o mesmo fenômeno (Fig.17). Havia alta expressão de CLDN1 basal (pré-infecção) e, após o processo de infecção com plasma VHC negativo, houve inibição da expressão de CLDN1 de superfície, de modo semelhante ao verificado com plasma VHC+. A média de expressão de CLDN1 de superfície em plaquetas incubadas com plasma VHC negativo foi de 44,83% com MIF de 16,36, ao passo que o valor intracitoplasmático foi de 60,63% com MIF de 50,69 (tabela 3), ficando evidente a diminuição da expressão deste receptor na superfície e aumento da expressão intracelular pós-permeabilização.

Para estar associado à endocitose este fenômeno de redução da expressão de CLDN1 e aumento da expressão intracelular deveria ocorrer apenas nas amostras incubadas com plasma VHC+, não sendo reproduzido em plaquetas incubadas com plasma VHC negativo, desta forma, desconsideramos esta hipótese.

Figura 17 - Overlay da expressão de CLDN1 basal e de superfície e intracelular de plaquetas incubadas com plasma VHC + (A) e plasma VHC – (B).



Gráficos de sobreposição de plaquetas incubadas com plasma VHC⁺ (A) e plasma VHC⁻ (B). Observa-se que em ambos os casos houve diminuição da expressão de CLDN1 de superfície (MIF 17,65 – VHC⁺; MIF 16,36 – VHC⁻) quando comparamos com o valor basal (pré-infecção – MIF 33,18) e aumento da expressão de CLDN1 intracitoplasmática (MIF 39,70 – VHC⁺; MIF 50,69 – VHC⁻). Fonte: material elaborado pelo autor.

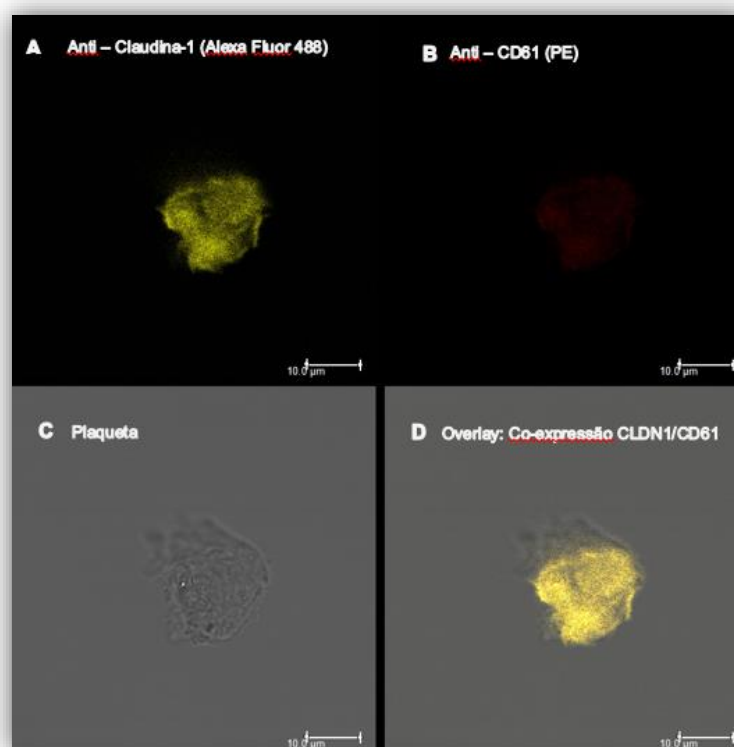
Tabela 3 - Expressão de CLDN1 pós-infecção *in vitro* com plasma VHC negativo.

Doador	% CLDN1 de superfície	MIF CLDN1 de superfície	MIF CLDN1 intracitoplasmática	MIF CLDN1 intracelular
Doador 1	46,47%	16,55	47,98%	48,26
Doador 2	47,37%	16,11	65,05%	28,9
Doador 3	52,42%	17,94	63,75%	45,75
Doador 4	33,07%	14,86	65,74%	79,85
Média	44,83%	16,36	60,63%	50,69

Outra hipótese para explicar o aumento da expressão intracitoplasmática deste receptor no citoplasma plaquetário pode estar associada às características do anticorpo monoclonal anti-claudina-1, utilizado nos testes. Se o anticorpo for dirigido contra epítipo comum presente tanto na face externa quanto interna da membrana, visto que CLDN1 é uma proteína transmembranária, a reação poderia ser intensificada após a permeabilização, conforme representação da proteína demonstrada na figura 6.

Apesar desta ocorrência, é fato a existência de CLDN1 em plaqueta como demonstrando por citometria e microscopia confocal (fig. 18). A CLDN1 é uma proteína de junção, localizada na superfície apical e basolateral dos hepatócitos, importante para entrada do VHC. Estudos demonstram que a adição deste receptor em células que não a expressam, tornam estas suscetíveis ao vírus, em contrapartida, o bloqueio deste receptor utilizando anticorpos dirigidos a esta proteína impedem a infecção viral *in vivo* e *in vitro* (FÉNÉANT *et al.*, 2015). Outros estudos utilizando linhagens celulares de hepatócito sugerem que CLDN6 e CLDN9 também poderiam estar envolvidos na entrada do vírus. Desta forma, a família das claudinas tem sido alvos de estudo para o desenvolvimento de terapia antiviral (FOFANA *et al.*, 2014).

Figura 18 - Expressão de Claudina-1 em plaquetas infectadas com VHC por microscopia confocal.

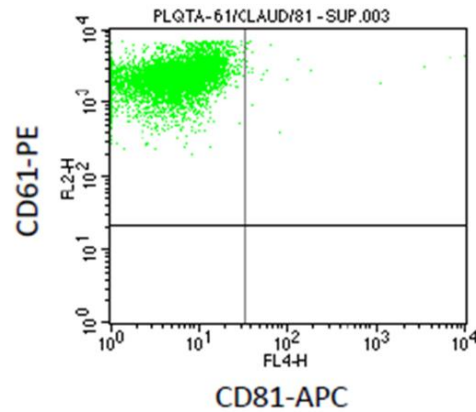


A) Expressão de CLDN1 na superfície plaquetária; B) Expressão de CD61; C) Imagem de plaqueta em campo claro; D) Sobreposição das figuras A, B e C. Fonte: Material elaborado pelo autor.

Quanto ao receptor CD81, denominado de TAPA-1, nossos resultados estão de acordo com a literatura, na qual é difundido que esta proteína não é expressa em plaquetas (ZAHN *et al.*, 2006; HAMAIA *et al.*, 2010; PADOVANI, 2010), conforme pode

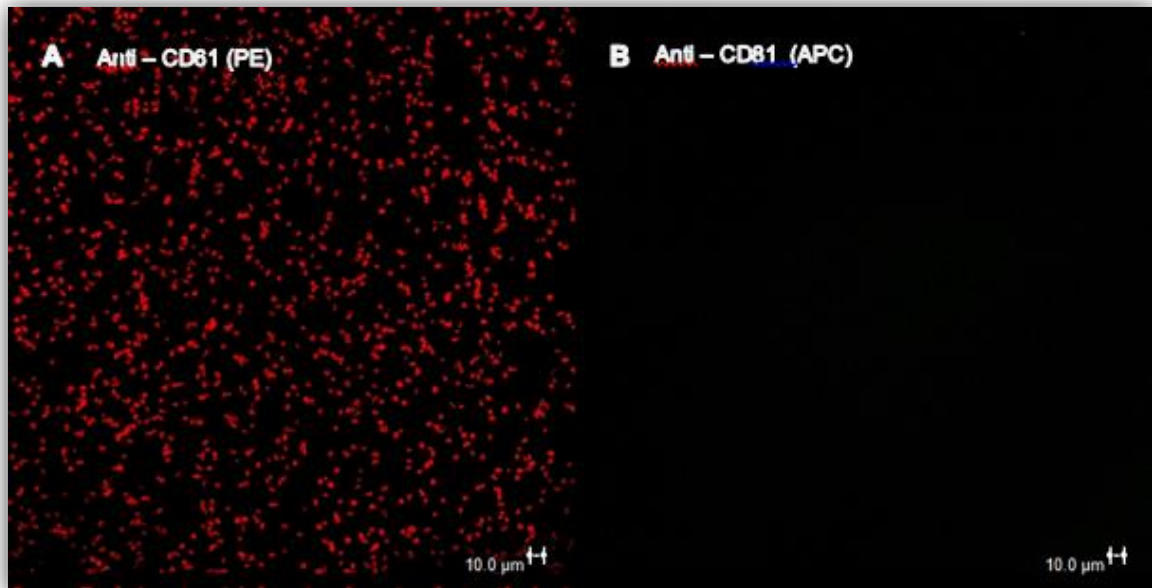
ser observado nas figuras 19 e 20, referentes a expressão do receptor CD81 por citometria de fluxo e microscopia confocal, respectivamente.

Figura 19- Expressão negativa do CD81 em plaquetas



Dot-plot demonstrando fenótipo de CD61+/CD81- em plaquetas. Fonte: material elaborado pelo autor.

Figura 20- Microscopia confocal de plaquetas CD61+/CD81-



Esfregaço plaquetário: A) CD61⁺ (vermelho); B) CD81⁻ (azul). Fonte: material elaborado pelo autor.

O mecanismo de entrada ou interação do VHC em plaquetas ainda é desconhecido, porém, estudos conduzidos por Hamaia *et al.* (2001) utilizando células que expressavam CD81 (células T-Molt4) e ausentes deste marcador (linhagem pro-monocítica U937 e plaquetas) demonstram taxas semelhantes de ligação com VHC,

concluindo que a interação entre o vírus pode acontecer mesmo na ausência deste receptor, reforçando a ideia de que o VHC poderia interagir com plaquetas por adsorção ou associados a moléculas de adesão como as integrinas GPIV ou HPA-1 (SATTENTAU, 2008; PADOVANI, 2010).

Além do mais, sabe-se que o vírus da hepatite C pode infectar os hepatócitos de duas formas, **de forma direta**, ligando-se aos receptores SRB1 e complexo CD81-CLDN1, seguindo múltiplas etapas, envolvendo uma série de fatores para a entrada do vírus na célula e através da **infecção por contato**, denominada célula-a-célula.

A infecção célula-a-célula ocorre geralmente em vírus que possuem envoltório de proteção, como é o caso do VHC e do HIV. A concepção principal deste mecanismo é a capacidade de se transmitir vírus diretamente para células vizinhas. Há pouca descrição sobre os mecanismos envolvidos nesta via de infecção, porém sabe-se que este tipo de interação atua como mecanismo de escape para o vírus, burlando a ação de células do sistema imune e anticorpos dirigidos contra o vírus, podendo ter envolvimento nos processos de recidivas ou persistência viral. Nesta forma de infecção, há dúvidas sobre o papel do CD81, pois parece ser este dispensável neste processo (SATTENTAU, 2008; WITTEVELDT *et al.*, 2009; FOFANA *et al.*, 2014; GRAW *et al.*, 2015).

Este tipo propagação viral por contato envolve principalmente os receptores claudina-1 e ocludina, proteínas de junção importantes na composição estrutural e funcional do transporte paracelular (TAWAR *et al.*, 2015).

Estudos recentes vêm apontando que claudina-1 pode se ligar as proteínas E1 ou E2 do VHC e que o heterodímero, composto pelas proteínas estruturais E1/E2, reconhece CLDN1 na superfície celular. Logo, os dados disponíveis indicam que CLDN1 tem papel duplo na entrada do VHC mediando à interação direta ou devido à composição do complexo CD81-CLND1, no qual atua como co-receptor (TAWAR *et al.*, 2015). Baseado nesta premissa, podemos elencar claudina-1, presente em plaquetas, como uma molécula envolvida na interação entre plaquetas e VHC, talvez de modo isolado ou como co-receptor com outras moléculas. Estudos investigando estas vias de interação podem ser úteis para a compreensão do real papel de CLDN1 na transmissão célula-a-célula.

A ocludina também desempenha papel importante na infecção célula-a-célula. Zhu *et al.* (2014) relatam que a interação entre o VHC e OCLN ocorre entre a proteína estrutural E2 do vírus e o segundo *looping* extracelular da OCLN (fig. 6), porém ainda não está esclarecido se esta interação ocorre de maneira direta ou indireta. Esta proteína de junção está presente na região basolateral de hepatócitos, porém, não há relatos na literatura que reportem a presença de OCLN em plaquetas.

Apesar dos mecanismos de interação e entrada do vírus por esta via serem pouco compreendidos, tem-se claro que tanto CLDN1 e OCLN são fatores essenciais para a entrada do VHC por transmissão célula-a-célula (DUBUISSON; COSSET, 2014; FÉNÉANT, L. *et al.*, 2015; SHIRASAGO *et al.*, 2016). Além disso, quando estes receptores virais são bloqueados em células suscetíveis ao VHC, ocorre diminuição da entrada de partículas virais, demonstrando sua importância no processo de infecção (LYU *et al.*, 2015).

Informações sobre os receptores que interagem com o vírus são importantes, pois determinam a quantidade de tipos celulares suscetíveis ao vírus, contudo, não determina se àquela célula portadora do vírus terá uma infecção eficaz (HAMAIA *et al.*, 2010). Entende-se que infecção eficaz é aquela que ocorre formação e liberação de novos vírus, para tanto é necessário que a célula tenha capacidade de replicar o gene viral, exemplo disso, é a presença do microRNA-122 (miR-122), amplamente expresso no fígado, que quando combinado com receptores CD81, SRB1 e CLDN-1 favorece a expressão do genoma do VHC tornando o fígado o principal alvo das partículas virais. Células que não expressam este micro-RNA não suportam a replicação viral (DUBUISSON; COSSET, 2014, ZEISEL *et al.*, 2015).

Nossos dados não nos permitem afirmar qual o mecanismo de interação entre o VHC e plaquetas, no entanto, conforme elucidado anteriormente, esta pode ocorrer através de um processo de adsorção devido à morfologia plaquetária ou mediada via receptores, como glicoproteína VI, HPA-5b e HPA-1b ou pela claudina-1, encontrada por este estudo. Do mesmo modo, não podemos afirmar se as plaquetas teriam a capacidade de suportar a replicação viral, posto que não se adotou metodologia para verificar tal fim, visto que este não era o objetivo deste estudo. No entanto, trabalho conduzido pelo nosso grupo tem demonstrado que a presença de plaquetas no tecido hepático contribui de alguma forma para o processo de agravamento da fibrose, seja

através de alterações em níveis de fatores solúveis, principalmente inflamatórios, como mencionado por Assinger (2014) ou por outras alterações como a presença de megacariócitos, células-progenitoras que em condições normais estariam alojadas apenas na medula óssea.

4.2. Megacariócitos

4.2.1. Avaliação da presença do vírus da hepatite C na superfície e intracitoplasmático em megacariócito por citometria de fluxo e microscopia confocal.

Para avaliar se os precursores de plaquetas também são suscetíveis ao vírus da hepatite C, nós avaliamos por citometria de fluxo e microscopia confocal a expressão do vírus em megacariócitos saudáveis após incubação com plasma VHC positivo (100.000UI/mL).

A estratégia de análise foi realizada conforme descrito no item 3.5.5 e o estabelecimento do índice com a finalidade de verificar a presença do VHC na superfície e no citoplasma de MK, utilizou o mesmo critério que estabelecido em plaquetas descrito no item 4.1.1. Os resultados podem ser visualizados na tabela 4.

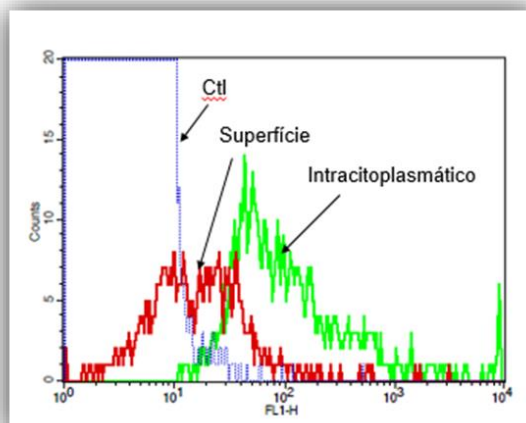
Tabela 4 - Expressão de VHC na superfície e intracitoplasmático em megacariócitos (percentual e MIF).

Doador	% NS4A de superfície	MIF NS4A de superfície	% NS4A Intracitoplasmática	MIF NS4A intracelular	Aumento da MIF
Doador 1	Amostra Utilizada Para Padronização				
Doador 2	51,56%	43,71	84,55%	107,46	2,46 vezes
Doador 3	11,01%	19,11	26,61%	21,29	1,12 vezes
Doador 4	53,57%	28,9	96,31%	48,26	1,66 vezes
Doador 5	56,46%	32,78	70,59%	60,43	1,84 vezes
Doador 6	85,96%	26,66	99,77%	79,15	2,97 vezes
Doador 7	Amostra utilizada somente para analise em Microscopia Confocal				
Média	51,53%	30,23	75,56%	63,32	2,01 vezes

Os dados gerados pela citometria evidenciaram a presença do VHC na superfície e no interior de megacariócitos. A média de células expressando o vírus na superfície foi 51,53% e MIF de 30,23, enquanto, que a média intracitoplasmática foi de 75,56% e MIF de 63,32. Desta forma, observamos que houve aumento tanto do

percentual de células expressando vírus quanto dos sítios de ligação vírus-anticorpo fluorescente, após permeabilização, representando em média de 2,01 vezes mais intensidade de fluorescência no interior celular quando comparado à superfície (fig.21).

Figura 21- Expressão de VHC em megacariócitos infectados *in vitro*.

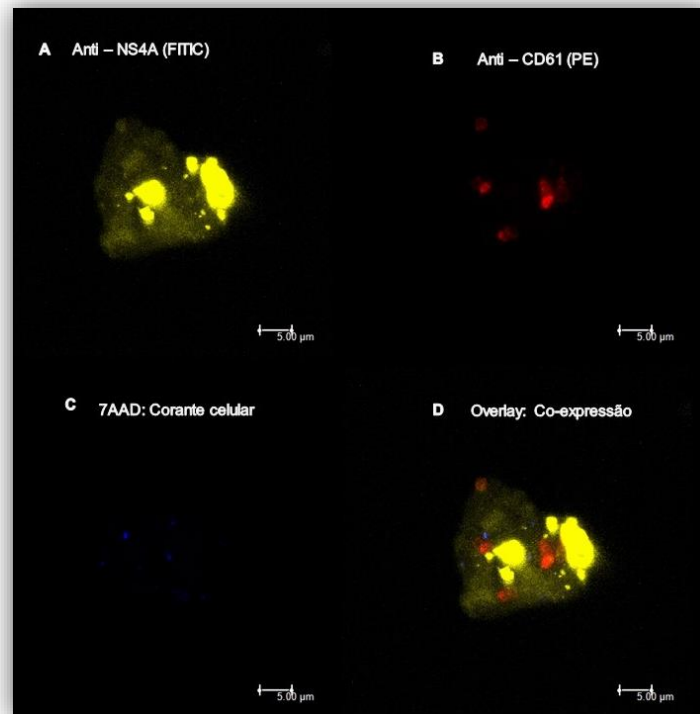


Histograma de sobreposição demonstrando a expressão viral (NS4A) em megacariócitos: superfície (vermelho), citoplasma (verde) e controle negativo (azul). Fonte: material elaborado pelo autor.

Estudos conduzidos por Li *et al.* (1999), com o objetivo de esclarecer melhor o quadro de trombocitopenia apresentado por pacientes com hepatite C, demonstraram que megacariócitos, proveniente de paciente com leucemia megacarioblástica, infectados *in vitro* com plasma VHC+, com condições de infecção semelhantes ao nosso experimento, apresentaram suscetibilidade ao vírus.

A fim de fundamentar os dados obtidos por citometria de fluxo, lâminas de megacariócitos infectados foram preparadas segundo descrito nos itens 3.5.5 e 3.5.6. As imagens foram feitas utilizando o Microscópio Confocal de Varredura a laser TCS SP5 – Leica com auxílio do Software LAS AF versão 2.7.3.9723. A figura 23-A nos mostra a presença de VHC em megacariócitos e, assim como observado por Li *et al.* (1999), verificamos fluorescência tanto na superfície quanto no interior celular (fig.24), com áreas de maior concentração viral.

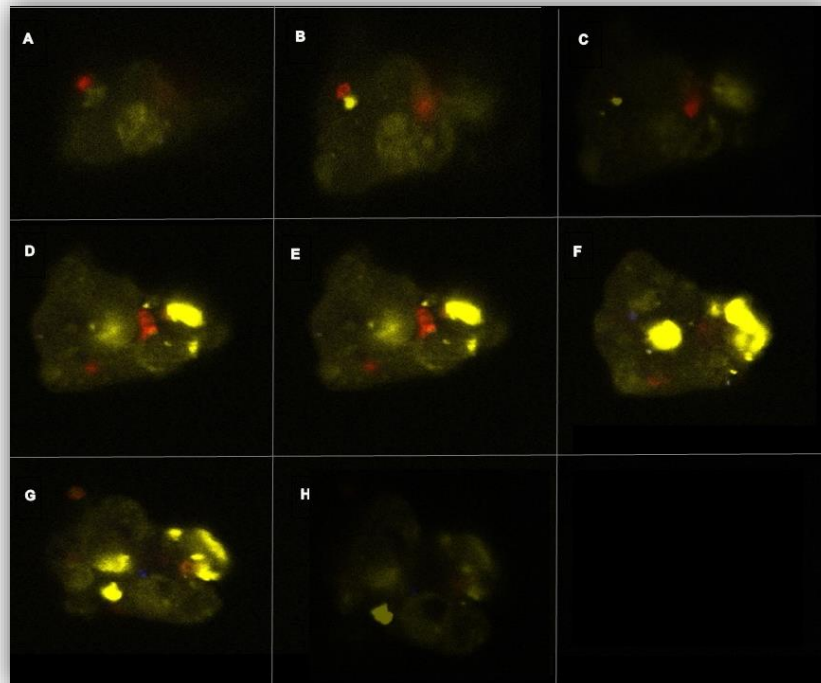
Figura 22- Microscopia confocal da superfície de megacariócitos infectados *in vitro* com VHC.



A) Expressão do VHC (Anti-NS4A) na superfície de megacariócitos. B e C) caracterização de megacariócitos CD61+ e corante nuclear 7AAD+. D) Sobreposição das imagens A, B e C. Fonte: material elaborado pelo autor.

A presença de vírus intracitoplasmático também foi verificada por Li *et al.* (1999) através de análises de microscopia eletrônica, a qual permitiu demonstrar que os vírus tendem a se acumular ao entorno do complexo de Golgi e vesículas presentes nos megacariócitos.

Figura 23- Microscopia confocal de megacariócitos infectados *in vitro* com VHC em diferentes camadas celulares, evidenciando conteúdo intracitoplasmático.



Fonte: material elaborado pelo autor.

A figura 24 representa uma cinética de imagens capturadas de acordo com níveis de profundidade da análise em megacariócitos, sendo que amarelo representa a expressão de NS4A (vírus), vermelho CD61 (positivo em megacariócitos) e raros pontos em azul, representando 7-AAD (corante nuclear). 24-A e 24-B ilustram a expressão do VHC nas camadas mais superficiais de megacariócitos (região apical); Fig.24 C-G representam camadas intracelulares, sendo possível observar através da intensidade de fluorescência o predomínio do vírus no citoplasma de megacariócitos. Fig. 24-H a diminuição da fluorescência demonstra a região basal.

Estudos independentes realizados por Radkowi *et al.* (2000), Abou El Azm *et al.* (2012) e Kedia *et al.* (2014) mostraram a presença de VHC na medula óssea de pacientes portadores de hepatite C, porém esse fenômeno não se reproduziu em todos os indivíduos incluídos nos estudos, sendo relatada uma associação com o nível de viremia. Alterações na medula como a hipoceluridade e hiper celularidade de linhagens eritróides, linfóides e mielóides também foram descritas, fato este atribuído às diferenças de carga viral, subtipo viral, estado imunológico ou devido a depósitos de imunocomplexos.

Outro dado interessante relatado por Abou El Azm *et al.* (2012) foi a ocorrência de diminuição da população megacariocítica, aparecimento de micro-megacariócitos, anormalidades na proliferação e diferenciação de células-tronco hematopoiéticas, demonstrando assim que o VHC pode interagir diretamente com estas células, podendo ter relação com a diminuição nos níveis de plaquetas circulantes. Estas evidências corroboram com El-Barbary *et al.* (2010) o qual encontrou diminuição nas unidades formadoras de colônia megacariocíticas (CFU-MK) e plaquetopenia circulante em paciente VHC+.

É fato que VHC compromete as funções dos hepatócitos, importantes produtores e secretores de TPO. A TPO é um fator de crescimento que atua durante todo o processo de maturação e formação de plaquetas, assim, a redução deste influencia diretamente na ploidia e desenvolvimento dos megacariócitos, resultando na diminuição do número de plaquetas geradas. Outra via que favorece o quadro de trombocitopenia é presença de RNA viral em megacarioblastos e megacariócitos, levando estas células a processo de morte celular ou diminuição dos receptores c-Mpl (LI *et al.*, 1999; AFDHAL; MCHUTCHISON, 2007; ASSINGER, 2014). A interação dos megacariócitos com VHC também promove desequilíbrio nos níveis de TPO circulante, devido ao fato de não haver células consumidoras deste fator, níveis séricos de TPO estão significativamente mais elevados em pacientes com hepatite C crônica (EL-BARBARY *et al.*, 2010).

Analises moleculares vem demonstrando que megacariócitos podem suportar a replicação do vírus devido detecção da fita complementar do RNA viral (LI *et al.*, 1999; MAZIN *et al.*, 1994; RADKOWSKI *et al.*, 2000; ABOU EL AZM *et al.*, 2012). Baseado nesta premissa e na presença do VHC intracitoplasmático, podemos inferir sobre a possibilidade do VHC ser carregado e transferido no processo de diferenciação de megacariócitos em proplaquetas, resultando em plaquetas jovens infectadas, semelhante ao que ocorre no vírus que provoca a gripe suína (ZAHN *et al.*, 2006).

4.2.2. Avaliação dos receptores virais claudina-1 e CD81 em megacariócitos incubados com plasma VHC positivo e negativo.

Assim como realizado em plaquetas, nós avaliamos a presença de claudina-1 e CD81 em megacariócitos, principais receptores do VHC. As técnicas utilizadas foram citometria de

fluxo e microscopia confocal, o protocolo de incubação e a estratégia de análise utilizadas estão descritas nos itens 3.5.5 e 3.5.6.

Os resultados da expressão de CLDN1 e CD81 estão apresentados nos quadros 4 e 5, respectivamente.

Quadro 4- Valores percentuais da expressão de CLDN1 e média de intensidade de fluorescência em megacariócitos.

Doador	% CLDN1 VHC+	MIF CLDN1 VHC+	% CLDN1 VHC negativo	MIF CLDN1 VHC negativo
Doador 1	Amostra Utilizada Para Padronização			
Doador 2	Amostra com pouca concentração celular			
Doador 3	70,46%	21	46,26%	15,4
Doador 4	94,07%	32,49	47,51%	14,99
Doador 5	73,86%	33,38	90%	26,18
Doador 6	79,52%	25,03	95,24%	28,39
Doador 7	Amostra utilizada somente para análise em Microscopia Confocal			
Média	79,50%	28	69,75%	21,25

Quadro 5- Valores percentuais da expressão de CD81 e média intensidade de fluorescência em megacariócitos.

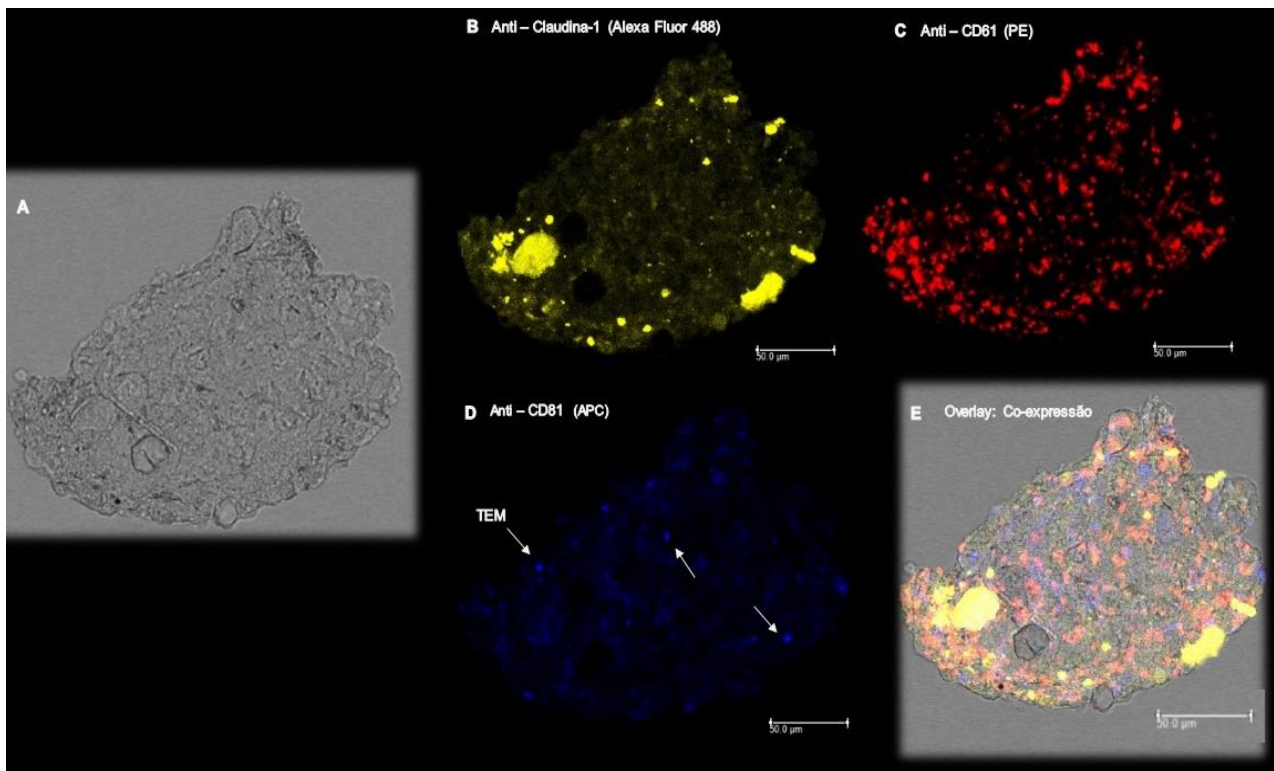
Doador	% CD81 HVC+	MIF CD81 HVC+	% CD81 HVC negativo	MIF CD81 HVC negativo
Doador 1	Amostra Utilizada Para Padronização			
Doador 2	Amostra com pouca concentração celular			
Doador 3	60,38%	41,42	81,01%	36,85
Doador 4	81,20%	65,52	71,78%	70,41
Doador 5	50,70%	403,15	49,15%	82,79
Doador 6	52,15%	373,48	68,30%	231,86
Doador 7	Amostra utilizada somente para análise em Microscopia Confocal			
Média	61,11%	220,90	67,56	105,48

O quadro 4 apresenta os valores percentuais de expressão de claudina-1 em megacariócitos incubados com plasma VHC positivo (em azul) e plasma VHC negativo (rósea). MK-VHC+ tiveram média de expressão de 79,50% e MIF de 28, enquanto que MK-VHC- apresentaram média de positividade de 69,75% e MIF de 21,25.

O quadro 5 faz referência aos valores da expressão do receptor CD81 em megacariócitos. É possível verificar que a média de CD81 em MKs incubados com plasma VHC⁺ foi de 61,11% com MIF de 220,90 enquanto que em MK incubados com plasma VHC⁻ este valor foi de 67,56% com uma MIF de 105,48. Quando comparamos os valores percentuais entre os MK incubados com plasma VHC⁺ e VHC⁻ pode-se observar que estes valores são próximos, no entanto, quando se compara as MIFs, observa-se que o valor da MIF em MK incubadas com plasma VHC⁺ esta dobrada em relação àquelas incubadas com VHC⁻, o que levanta a possibilidade de imunomodulação mediante a presença do VHC, no entanto, maiores estudos devem ser realizados para confirmação desta hipótese.

Nosso objetivo era analisar de forma qualitativa a expressão dos receptores CD81 e CLDN1 em megacariócitos. Desta forma, tanto os dados obtidos pela imunofenotipagem quanto pela microscopia confocal demonstram a presença de claudina-1 e CD81 em megacariócitos (Fig.24).

Figura 24- Expressão dos receptores claudina-1 e CD81 em megacariócitos.



A) Morfologia de megacariócitos; B-C) expressão de CLDN1 e CD81, respectivamente; D) distribuição da proteína CD81 e micro-domínios de tetrapasnina (TEM); E) sobreposição de imagem (Overlay).
Fonte: material elaborado pelo autor.

Claudina-1 é uma das proteínas mais estudadas na entrada do VHC nas células, atua na infecção seja pela forma direta, se ligando ao CD81, ou pela infecção célula-a-célula. A presença de claudina-1 é descrita tanto na região apical como basolateral de hepatócitos. Nos megacariócitos observamos a preponderância de expressão de CLDN1 em determinadas regiões celulares (fig.25-B). A posição em que está proteína se localiza na célula é importante, pois pode facilitar o contato com o VHC (HOLCZBAUER *et al.*, 2014; TORRES-FLORES; ARIAS, 2015).

É difundido na literatura que CLDN1 e CD81 desempenham papel crucial para a entrada do VHC em hepatócitos. A entrada do vírus é um fenômeno complexo que requer a ligação de várias proteínas transmembranares. Ao chegar nos hepatócitos através da corrente sanguínea, o vírus fixa-se aos glicosaminoglicanos e ao receptor de lipoproteínas de baixa densidade (LDL-R). Após esta etapa, as partículas virais interagem com os receptores *scavenger* SRB1, CD81 e CLDN1 e OCLN, conforme relatado anteriormente. CD81, em especial, desempenha um papel importante na

entrada de VHC devido a sua interação direta com a glicoproteína E2 do envelope viral (BOUCHEIX; RUBINSTEIN, 2001; ZHU *et al.*, 2012 DAHMANE *et al.*, 2014; FÉNÉANT *et al.*, 2015; TAWAR *et al.*, 2015).

O CD81 pertence a superfamília das tetraspanina composta de quatro domínios transmembranares, dois extracelulares (EC1 e EC2) e dois domínios intracelulares, está presente em diversas linhagens celulares como hepatócitos e megacariócitos. Distinguem-se de outras proteínas transmembranares devido à presença de regiões conservadas nos seus domínios extracelulares que favorecem a associação entre si e com outras proteínas, como integrinas, moléculas de sinalização e proteínas homo e heterodímero, para formar micro-domínios enriquecidos de tetraspanina – TEM - (do inglês- tetraspanin-enriched microdomain) (FITTER *et al.*, 1999, BOUCHEIX; RUBINSTEIN, 2001; HASSUNA *et al.*, 2009).

Os micros-domínios enriquecidos de tetraspanina são moléculas organizadoras envolvidas no tráfego de moléculas, fusão célula-célula, motilidade e sinalização. Estudos apontam que este micro-domínios são usados por patógenos, como VHC e HIV, como porta de entrada na célula. Numerosos estudos demonstraram que a susceptibilidade de infecção por VHC está intimamente relacionada com o nível de expressão de CD81 e a presença de micro-domínios enriquecidos de tetraspaninas, favorecendo a entrada do vírus, pois facilita as vias de ativação envolvidas no processo de internalização e endocitose (HASSUNA *et al.*, 2009; ZHU *et al.*, 2012; DAHMANE *et al.*, 2014).

Observamos que a expressão de CLDN1 nos megacariócitos não é distribuída de maneira homogênea, concentrando-se em determinadas regiões celulares (fig. 25-B). Se considerarmos que a entrada do VHC em hepatócitos é promovida pela associação entre CD81 e CLDN1, e que, este complexo favorece a formação das TEM, as quais, concentram-se em algumas regiões celulares, podemos inferir que processo semelhante ocorra nos megacariócitos.

Além disso, conforme relatado por Li *et al.* (1999) verificou-se a presença da fita complementar ao RNA viral em megacariócitos. Estudos de Mazin *et al.* (1994), Radkowski *et al.* (2000), Pawełczyk *et al.* (2009) utilizando medula óssea também obtiveram o mesmo resultado. Estas evidencias sugerem que megacariócitos são capazes de suportar e formar novos vírions, assim, podemos inferir que durante o

processo de fragmentação citoplasmática, no qual, ocorre a formação das proplaquetas, o VHC presente no citoplasma megariocítico possa ser transferido para plaquetas, sendo estas liberadas na corrente sanguínea infectadas.

Este estudo possibilitou demonstrar a presença de VHC na superfície plaquetária, e de modo inédito, a expressão viral no citoplasma destas células. Ademais, verificou-se a existência de vírus na superfície e citoplasma megacariocítico. Desta forma este trabalho corrobora com dados da literatura, os quais relatam resultados semelhantes e apontam que estas interações podem estar relacionadas à diminuição de plaquetas circulantes, seja por interação direta do vírus com estas células, induzindo processos apoptóticos ou por alterações no processo de maturação de células progenitoras.

Além disso, apresentamos um modelo de infecção *in vitro* que possibilita ser aplicado em futuros estudos da interação do VHC com megacariócitos e plaquetas, sendo útil ao entendimento dos mecanismos envolvidos na infecção de diferentes tipos celulares, desde a interação viral, vias de infecção e sinalização celular, caracterização de veículos e/ou reservatórios de replicação do vírus da hepatite C.

5. Conclusão

Nosso estudo demonstrou a presença do vírus da hepatite C, pós-infecção *in vitro*, em plaquetas e megacariócitos provenientes de doadores saudáveis, verificando a expressão viral tanto na superfície como no interior de ambas as células, podendo estas serem carreadoras e/ou sítios de replicação do VHC.

Analisando a expressão dos receptores claudina-1 e CD81 em plaquetas verificamos que CD81 está ausente nestas células, no entanto, claudina-1 é expressa. Ao passo que megacariócitos expressam ambos receptores CD81⁺/CLND1⁺.

Baseado em evidências literárias consideramos que megacariócitos podem ser possíveis sítios de replicação viral, tendo em vista que compartilham de características semelhantes aos hepatócitos, no que se refere aos receptores classicamente envolvidos na entrada do vírus. Relacionando com achados da literatura que apontam a presença de fita complementar do RNA viral em megacariócitos podemos inferir que estas células podem ser sítios de replicação viral. Maiores estudos avaliando esta possível capacidade de replicação em MK podem ser

uteis, especialmente, devido a possibilidade deste precursor transferir vírus para plaquetas, liberando-as na corrente sanguínea já infectadas.

Em suma, nosso estudo apresenta um modelo de infecção de VHC *in vitro* eficaz tanto em plaquetas como em megacariócitos, que pode contribuir para estudos futuros relacionados à fisiopatologia da hepatite C.

Referências

ABOU EL AZM, A. R. et al. Correlation of viral load with bone marrow and hematological changes in pale patients with chronic hepatitis C virus. **Arch. Virol.**, v. 157, n. 8, p.1579-1586, 2012.

AFDHAL, N. H.; MCHUTCHISON, J. G. Review article: pharmacological approaches for the treatment of thrombocytopenia in patients with chronic liver disease and hepatitis C infection. **Aliment. Pharmacol. Ther.**, v. 26, suppl. 1, p. 29-39, 2007.

ALMEIDA, A. J. et al. Hepatite C hepatitis C virus-associated thrombocytopenia: a controlled prospective, virological study. **Ann. Hematol.**, v. 83, n. 7, p. 434-440, 2004

ALMEIDA, A. J. et al. Detection of hepatitis C virus in platelets: evaluating its relationship to antiviral therapy outcome. **Hepatogastroenterology**, v. 56, n. 90, p. 429-436, 2009.

ALTER, H. J. An unexpected link between HCV and platelets. **Inside Blood**, v. 98, n. 8, p. 2291, 2001.

ANTONY, B. A.; LINK, D. C. Regulation of hematopoietic stem cells by bone marrow stromal cells. **Trends Immunol.**, v. 35, n.1, p. 32-37, 2014.

ARIEDE, J. R. et al. Platelets can be a biological compartment for the Hepatitis C Virus. **Braz. J. Microbiol.**, v. 46, n. 2, p. 627-629, 2015.

ASSINGER, A. Platelets and infection- an emerging role of platelets in viral infection. **Front. Immunol.**, v. 5, p. 649, 2014. doi: 10.3389/fimmu.2014.00649. eCollection 2014.

BARTOSCH, B.; DUBUISSON, J. Recent advances in hepatitis C virus cell entry. **Viruses**, v. 2, n. 3, p. 692-709, 2010.

BOUCHEIX, C.; RUBINSTEIN, E. Tetraspanins. **Cell. Mol. Life Sci.**, v. 56, n. 9, p. 1189-1205, 2001.

COGNASSE, F. et al. Evidence of toll-like receptor molecules on human platelets. **Immunol. Cell Biol.**, v. 83, n. 2, p. 196-198, 2005.

CRAMER, E. M.; FONTENAY, M. Platelets: structure related to function. In: COLMAN, R. W. et al. **Hemostasis and thrombosis: basic principles and clinical practice**. Philadelphia: Editora Lippincott Williams e Wilkins, 2006. cap. 26. p.463-482.

DAHMANE, S. et al. Viruses and tetraspanins: lessons from single molecule approaches. **Viruses**, v. 6, n. 5, p. 1992-2011, 2014.

DUBUISSON, J.; COSSET, F. L. Virology and cell biology of the hepatitis C virus life cycle – An update. **J. Hepatol.**, v. 61, suppl. 1, p. S3-S13, 2014.

EL-BARBARY, M. A. et al. Thrombocytopenia in patients with chronic hepatitis C: a possible role of HCV on platelet progenitor cell maturation. **Angiology**, v. 61, n. 3, p. 304-313, 2010.

FARIAS, M. G.; BIERMANN, M. B. Análise morfológica, imunofenotípica e molecular na identificação da leucemia megacariocítica aguda (LMA-M7). **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, v. 29, n. 4, p. 387-393, 2007.

FAVIER, R.; RASLOVA, H. Progress in understanding the diagnosis and molecular genetics of macrothrombocytopenias. **Br. J. Haematol.**, v. 170, n. 5, p. 626-639, 2015.

FÉNÉANT, L. et al. CD81 and Hepatitis C Virus (HCV) infection. **Viruses**, v. 2, n. 3, p. 692-709, 2014.

FÉNÉANT, L. et al. Claudin-6 and occludin natural variants found in a patient highly exposed but not infected with Hepatitis C Virus (HCV) do not confer HCV resistance In vitro. **PLoS One**, v. 10, n.11, p. e0142539, 2015.

FÉNÉANT, L. et al. New insights into the understanding of hepatitis C virus entry and cell-to-cell transmission by using the ionophore monensin A. **J. Virol.**, v. 89, n. 16, p. 8346-8364, 2015.

FITTER, S. et al. Transmembrane 4 superfamily protein CD151 (PETA-3) associates with $\beta 1$ and $\alpha 1 \text{b} \beta 3$ integrins in haemopoietic cell lines and modulates cell–cell adhesion. **Biochem. J.**, v. 338, pt.1, p. 61-70, 1999.

FLETCHER, N. F. et al. Hepatitis C virus infects the endothelial cells of the blood-brain barrier. **Gastroenterology**, v. 142, n. 3, p. 634-643, 2012.

FRECH, D. L. Megakaryocyte put a foot through the door. **Blood**, v. 121, n. 13, p. 2379-2380, 2013.

GEDDIS, A. E. The regulation of proplatelet production. **Haematologica**, v. 94, n. 6, p. 756-759, 2009.

GOLIM, M. A. et al. Conjugação e validação de controle isotópico IgG1 -FITC para uso em citometria de fluxo. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, v. 29, n. 4, p. 361-368, 2007.

GRAW, F. et al. Quantification of Hepatitis C Virus cell-to-cell spread using a stochastic modeling approach. **J. Virol.**, v. 89, n. 13, p. 6551-6561, 2015.

HAHN, T. V.; RICE, C. M. Hepatitis C virus entry. **J. Biol. Chem.**, v. 283, n. 7, p. 3689-3693, 2008.

HAMAIA, S. et al. The dynamics of hepatitis C virus binding to platelets and 2 mononuclear cell lines. **Blood**, v. 98, n. 8, p. 2293-2300, 2001.

HASSUNA, N. et al. Strategies for targeting tetraspanin proteins: potential therapeutic applications in microbial infections. **BioDrugs**, v. 23, n. 6, p. 341-359, 2009.

HOFFBRAND, A. V.; MOSS, P. A. H. Hematopoese. In:____. **Fundamentos da Hematologia**. Porto Alegre: Artmed, 2013. cap. 1, p.01-13.

HOFFBRAND, A. V.; MOSS, P. A. H. Plaquetas, coagulação do sangue e hemostasia. In:____. **Fundamentos da Hematologia**. Porto Alegre: Artmed, 2013. cap. 24, p.314 - 327.

HOLCZBAUER, A. et al. Increased Expression of Claudin-1 and Claudin-7 in Liver Cirrhosis and Hepatocellular Carcinoma. **Pathol. Oncol. Res.**, v. 20, n. 3, p. 493-502, 2014.

HSU, M. et al. Hepatitis C virus glycoproteins mediate pH-dependent cell entry of pseudotyped retroviral particles. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 100, n. 12, p. 7271-7276, 2003.

IKOMA, M. R. V. **Interleucina 6 e megacariocitopoese em pacientes portadores de Púrpura Trombocitopênica Imune**. 2001. 97 f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2001.

ISHIBASHI, T. et al. Separation of human megakaryocytes by state of differentiation on continuous gradients of Percoll: size and ploidy analysis of cells identified by monoclonal antibody to glycoprotein IIb/IIIa. **Blood**, v. 67, n. 5, p. 1286-1292, 1986.

ITALIANO-JR, J. E. et al. Blood platelets are assembled principally at the ends of proplatelet processes produced by differentiated megakaryocytes. **J. Cell Biol.**, v. 147, n. 6, p. 1299-1312, 1999.

KEDIA, S. et al. Benign and Malignant Hematological Manifestations Chronic Hepatitis C Virus Infection. **Int. J. Prevent. Med.**, v. 5, suppl. 3, p. S179-192, 2014.

KHULLAR, V.; FIRPI, R. J. Hepatitis C cirrhosis: New perspectives for diagnosis and treatment. **World J. Gastroenterol.**, v. 7, n. 14, p. 1843-1855, 2015.

KONDO, Y.; SHIMOSEGAWA, T. Direct effects of hepatitis C virus on the lymphoid cells. **World J. Gastroenterol.**, n. 19, v. 44, p. 7889-7895, 2013.

KUPFER, B. HCV- virology. In: MAUSS, S. et al. **Hepatology: a clinical handbook**. 2. Ed. Düsseldorf: Flying Publisher, 2010. cap. 6, p. 61- 82.

LANDI, E. P.; MARQUES JUNIOR, J. F. M. Caracterização da ativação plaquetária nos concentrados de plaquetas por citometria de fluxo. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, n. 25, v. 1, p. 39-46, 2003.

LERAT, H. et al. Specific detection of Hepatitis C Virus minus strand RNA in hematopoietic cells. **J. Clin. Invest.**, v. 97, n. 3, p. 845-851, 1996.

LEVY, S. et al. CD 81 (TAPA-1): A molecule involved in signal transduction and cell adhesion in the immune system. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 16, p. 89-100, 1998.

Li, X. et al. Persistence of hepatitis C vírus in a human megakaryoblastic leukaemia cell line. **J. Viral Hepat.**, v. 2, n. 6, p. 107-114, 1999.

LI, X. et al. Persistence of hepatitis C vírus in a human megakaryoblastic leukaemia cell line. **J. Viral Hepat.**, v. 6, n. 2, p. 107-114, 1999.

LYU, J. et al. Roles of lipoprotein receptors in the entry of hepatitis C vírus. **World J. Hepatol.**, v. 7, n. 24, p. 2535-2542, 2015.

MACHLUS, K. R. et al. Interpreting the developmental dance of the megakaryocyte: a review of the cellular and molecular processes mediating platelet formation. **Br. J. Haematol.**, v. 165, n. 2, p. 227-236, 2014.

MACHLUS, K. R.; ITALIANO-JR, J. E. The incredible journey: from megakaryocyte development to platelet formation. **J. Cell Biol.**, v. 201, n. 6, p. 785-796, 2013.

MALARA, A. et al. The secret life of a megakaryocyte: emerging roles in bone marrow homeostasis control. **Cell. Mol. Life Sci.**, v. 78, n. 8, p. 1517-1536, 2015.

MAZIN, et al. Presence of hepatitis C virus (HCV) genomic RNA and viral replicative intermediates in bone marrow and peripheral blood mononuclear cells from HCV-infected patients. **Clin. Diagn. Lab. Immunol.**, v. 1, n. 2, p. 160-163, 1994.

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

MITCHELL, J. K. et al. How do persistent infections with hepatitis C virus cause liver cancer?. **Curr. Opin. Virol.**, v. 14, p. 101-108, 2015.

MORIISHI, K.; MATSUURA, Y. Exploitation of lipid components by viral and host proteins for hepatitis C virus infection. **Front. Microbiol.**, v. 3, p. 1-14, 2012.

MURATA, S. et al. Signal transduction of platelet-induced liver regeneration and decrease of liver fibrosis. **Int. J. Mol. Sci.**, v. 15, n. 4, p. 5412- 5425, 2014.

NWANESHIUDU, A. et al. Introduction to confocal microscopy. **J. Invest. Dermatol.**, v. 132, n. 3e, p. 1-5, 2012.

PADOVANI, J. L. **Detecção in vitro do vírus da hepatite C (VHC) em plaquetas provenientes de indivíduos não infectados expostos ao vírus.** 2010. 73 f.

Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2010.

PANTUA, H. et al. Glycan shifting on Hepatitis C Virus (HCV) E2 glycoprotein is a mechanism for escape from broadly neutralizing antibodies. **J. Mol. Biol.**, v. 425, n. 11, p. 1899-1914, 2013.

PATEL, S. R. et al. The biogenesis of platelets from megakaryocyte proplatelets. **J. Clin. Invest.**, v. 115, n. 12, p. 3348-3354, 2005.

PAWEŁCZYK, A. et al. Replication of HCV in bone marrow of patients with haematological disorders. **Przegl. Epidemiol.**, v. 63, n. 1, p. 29-33, 2009.

PUCHNER, K. P.; BERG, T. Extrahepatic manifestations. In: MAUSS, S. et al. **Hepatology: a clinical handbook**. Düsseldorf: Flying Publisher, 2010. Chap.16, p. 239-255.

RADKOWSKI, M. et al. Detection of active hepatitis C virus and hepatitis G virus/GB virus C replication in bone marrow in human subjects. **Blood**, v. 95, n. 12, p. 3986-3989, 2000.

SATTENTAU, Q. Avoiding the void: cell-to-cell spread of human viruses. **Nat. Rev. Microbiol.**, v. 6, n. 11, p. 815-826, 2008.

SHIRASAGO, Y. et al. Occludin-knockout human hepatic huh7.5.1-8-derived cells are completely resistant to Hepatitis C Virus Infection. **Biol. Pharm. Bull.**, 2016 Feb 17. Epub ahead of print.

SMITH, D. B. et al. Expanded classification of Hepatitis C Virus into 7 genotypes and 67 subtypes: updated criteria and genotype assignment web resource. **Hepatology**, v. 59, n. 1, p. 318-337, 2014.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE HEPATOLOGIA. **Consenso Sobre a Hepatite C Crônica da Sociedade Brasileira de Hepatologia**. São Paulo: SBH, 2014. 20 p.

SVOBODA, O.; BARTUNEK, P. Origins of the vertebrate erythro/megakaryocytic system. **Biomed Res. Int.**, 2015. ID 632171. doi: 10.1155/2015/632171.

TAWAR, R. G. et al. Claudins and pathogenesis of viral infection. **Semin. Cell Dev. Biol.**, v. 42, p. 39-46, 2015.

THON, J. N.; ITALIANO, J. E. Platelet formation. **Semin. Hematol.**, v. 47, n. 3, p. 220-226, 2010.

THON, J. N.; ITALIANO JUNIOR, J. E. Does size matter in platelet production?. **Blood**, v. 120, n. 8, p.1552-1561, 2012.

TOMER, A. et al. Flow cytometric analysis of megakaryocytes from patients with abnormal platelet counts. **Blood**, v. 74, n. 2, p. 594-601, 1989.

TOMER, A. et al. Flow cytometric analysis of normal human megakaryocytes. **Blood**, v. 71, n. 5, p. 1244-1252, 1988.

VASURI, F. et al. Histopathological evaluation of recurrent hepatitis C after liver transplantation: a review. **World J. Gastroenterol.**, v. 20, n. 11, p. 2810-2824, 2014.

WASMUTH, J. C. Hepatitis C- Epidemiology, transmission and natural history In: MAUSS, S. et al. **Hepatology: a clinical handbook**. Düsseldorf: Flying Publisher, 2010. cap. 3, p.19 - 30.

WESTBROOK, R. H.; DUSHEIKO, G. Natural history of hepatitis C. **J. Hepatol.** v. 61, suppl. 1, p. S58-68, 2014.

WITTEVELDT, J. et al. CD81 is dispensable for hepatitis C virus cell-to-cell transmission in hepatoma cells. **J. Gen. Virol.**, v. 90, pt.1, p. 48-58, 2009.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Hepatitis C**. Geneva: WHO, 2015. (Fact Sheet, 164). Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs164/en/>>. Acesso em: 4 fev. 2016.

WORTHINGTON, R. E. et al. Flow cytometric analysis of megakaryocyte differentiation. **Cytometry**, v. 5, n. 5, p. 501-508, 1984.

XIAO, F. et al. Hepatitis C Virus cell-cell transmission and resistance to direct-acting antiviral agents. **PLoS Pathog.**, v. 10, n. 5, p. 1-15, 2014.

XU, Z. et al. Synthesis of a novel hepatitis C virus protein by ribosomal frameshift. **EMBO J.**, v. 20, n. 14, p. 3840-3848, 2001.

ZAHN, A. et al. Hepatitis C virus interacts with human platelet glycoprotein VI. **J. Gen. Virol.**, v. 87, p. 2243-2251, 2006.

ZEISEL, M. B. et al. Host-targeting agents to prevent and cure hepatitis c virus infection. **Viruses**, v. 7, p. 5659-5685, 2015.

ZHONG, P. et al. Cell-to-cell transmission of viruses. **Curr. Opin. Virol.**, v. 3, n. 1, p. 44-50, 2013.

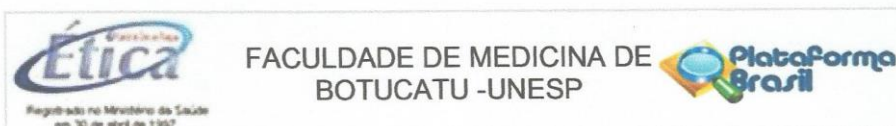
ZHU, Y. Z. et al. Significance of palmitoylation of CD81 on its association with tetraspanin-enriched microdomains and mediating hepatitis C virus cell entry. **Virology**, v. 429, n. 2, p. 112-123, 1012.

ZHU, Y. Z. et al. How hepatitis C virus invades hepatocytes: the mystery of viral entry. **World J. Gastroenterol.**, v. 20, n. 13, p. 3457-3467, 2014.

ZIGNEGO, A. L. et al. Hepatitis C virus lymphotropism: lessons from a decade of studies. **Dig. Liver Dis.**, v. 39, Suppl. 1, p. S38-45, 2007.

Anexo

A) Parecer Consubstânciado do CEP



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Hepatite C - metaplasia mielóide na gênese da fibrose hepática.
Pesquisador: Paulo Eduardo de Abreu Machado
Área Temática:
Versão: 3
CAAE: 14158713.5.0000.5411
Instituição Proponente: Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu
Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.354.285

Apresentação do Projeto:

Tratam os autos de Emenda enviada pelos pesquisadores, no sentido de dividir em 03 sub-Projetos o Projeto Maior na seguinte conformidade: *

Projeto maior: (Protocolo CAAE 14158713.5.0000.5411) Hepatite C-metaplasia mielóide na gênese da fibrose hepática, coordenado pelo Prof. Titular Paulo Eduardo de Abreu Machado, aprovado por este colegiado em 01/04/2013.

Sub-Projeto I: Detecção in vitro do vírus da hepatite C (VHC) em megacariócitos provenientes de indivíduos não infectados expostos ao vírus, a ser conduzido por Nathália Almeida Souza, orientada pela Profª Dra. Rejane Maria Tomasinini Grotto, Coorientada pelo Prof. Dr. Paulo Eduardo de Abreu Machado. (Mestrado)

Sub-Projeto II: Interação entre citocinas, plaquetas e fibrogenese na investigação da metaplasia mielóide hepática, a ser conduzido por Aline Márcia Marques Braz Rosso, orientada pela Profª Dr.ª Márjorie de Assis Golim e Co-orientada pelo Prof. Dr. Paulo Eduardo de Abreu Machado (Mestrado);

Endereço: Chácara Butignolli, s/n
Bairro: Rubião Junior
UF: SP **Município:** BOTUCATU
Telefone: (14)3880-1608
CEP: 18.618-970
E-mail: capellup@fmb.unesp.br



FACULDADE DE MEDICINA DE
BOTUCATU -UNESP



Continuação do Parecer: 1.354.285

Sub-Projeto III: Avaliação da infecção de megacariócitos e plaquetas pelo VHC e a influência na fisiopatologia da hepatite C, que será conduzido por Caroline Mitiká Watanabe, orientada por Prof. Dr. Paulo Eduardo de Abreu Machado e Co-Orientada pela Profa. Dra. Márjorie de Assis Golim (Mestrado).

Objetivo da Pesquisa:

Constante do Parecer nº 820.536 (Projeto maior)

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Constante do Parecer nº 820.536 (Projeto Maior)

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A subdivisão em 3 Subprojetos não alterou o delineamento inicial proposto. O propósito da divisão foi no sentido de explanar cada fase do estudo com o propósito de Dissertação a ser defendida.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

O TCLE não foi alterado, uma vez que trata-se do mesmo aplicado no projeto maior.

Recomendações:

Sugerimos Relatório Final de Atividades em separado para cada subprojeto defendido.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Sugiro aprovação da Emenda na seguinte conformidade: Divisão do Projeto maior em 3 subprojetos acima especificado.

Considerações Finais a critério do CEP:

O CEP em reunião de 07/12/2015 APROVOU a divisão de Projeto Maior em 3 Sub-Projetos à saber:

Sub-Projeto I: Detecção in vitro do vírus da hepatite C (VHC) em megacariócitos provenientes de indivíduos não infectados expostos ao vírus, a ser conduzido por Nathália Almeida Souza, orientada pela Profª Dra. Rejane Maria Tomasini Grotto, Coorientada pelo Prof. Dr. Paulo Eduardo de Abreu Machado. (Mestrado)

Sub-Projeto II: Interação entre citocinas, plaquetas e fibrogenese na investigação da metaplasia mieloide hepática, a ser conduzido por Aline Márcia Marques Braz Rosso, orientada pela Profª Dr.ª Márjorie de Assis Golim e Co-orientada: pelo Prof. Dr. Paulo Eduardo de Abreu Machado

Endereço: Chácara Butignolli, s/n

Bairro: Rubião Junior

CEP: 18.618-970

UF: SP

Município: BOTUCATU

Telefone: (14)3880-1608

E-mail: capellup@fmb.unesp.br



FACULDADE DE MEDICINA DE
BOTUCATU -UNESP



Continuação do Parecer: 1.354.285

(Mestrado);

Sub-Projeto III: Avaliação da infecção de megacariócitos e plaquetas pelo VHC e a influência na fisiopatologia da hepatite C, que será conduzido por Caroline Mitiká Watanabe, orientada por Prof. Dr. Paulo Eduardo de Abreu Machado e Co-Orientada pela Profa. Dra. Márjorie de Assis Golim (Mestrado).

O CEP aguarda envio de Relatório Final de Atividades em separado para cada subprojeto defendido, que deverá ser postado na Plataforma Brasil através de "NOTIFICAÇÃO".

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_623487 E2.pdf	13/11/2015 16:17:26		Aceito
Outros	Subprojeto_3_Caroline_Mitika.pdf	13/11/2015 16:10:06	Marjorie de Assis Golim	Aceito
Outros	Subprojeto_2_Aline_Braz.pdf	13/11/2015 16:08:02	Marjorie de Assis Golim	Aceito
Outros	Subprojeto_1_Nathalia_Almeida.pdf	13/11/2015 16:06:16	Marjorie de Assis Golim	Aceito
Outros	of_392.jpg	13/11/2015 15:57:38	Marjorie de Assis Golim	Aceito
Outros	of_391.jpg	13/11/2015 15:57:10	Marjorie de Assis Golim	Aceito
Folha de Rosto	Folha de Rosto - Emenda.pdf	15/09/2014 17:10:56		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	PROJETO FINAL - metaplasia - Emenda.pdf	15/09/2014 16:39:02		Aceito
Outros	Ofício ao CEP - alteração metodologia.pdf	15/09/2014 12:07:03		Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Autorização Jaú - Dr Vergilio.pdf	15/09/2014 11:47:02		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE -MO- DOADORES.pdf	15/09/2014 10:53:04		Aceito
Outros	CEP_DOCUMENTO_Dr Giovanni.jpg	11/03/2013 10:42:16		Aceito

Endereço: Chácara Butignolli, s/n

Bairro: Rubião Junior

CEP: 18.618-970

UF: SP

Município: BOTUCATU

Telefone: (14)3880-1608

E-mail: capellup@fmb.unesp.br



FACULDADE DE MEDICINA DE
BOTUCATU -UNESP



Continuação do Parecer: 1.354.285

TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE - doadores.doc	11/03/2013 09:37:53		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE - pacientes Hepatite.doc	11/03/2013 09:37:39		Aceito
Outros	DECLARA_PEAM (2).jpg	07/03/2013 12:14:37		Aceito
Outros	TERMO_COMPROMISSO_PEAM (2).jpg	07/03/2013 12:14:21		Aceito
Outros	dr. josé.pdf	07/03/2013 10:46:56		Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	dra. maria.pdf	07/03/2013 10:46:19		Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

BOTUCATU, 07 de Dezembro de 2015

Assinado por:
SILVANA ANDREA MOLINA LIMA
(Coordenador)

Endereço: Chácara Butignolli, s/n

Bairro: Rubião Junior

CEP: 18.618-970

UF: SP

Município: BOTUCATU

Telefone: (14)3880-1608

E-mail: capellup@fmb.unesp.br

Apêndice

A. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – Coleta Plaqueta



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA – HOSPITAL DAS CLÍNICAS
DIVISÃO HEMOCENTRO – BOTUCATU
DISTRITO DE RUBIÃO JÚNIOR S/Nº - BOTUCATU - SP - CEP: 13.618-000 - ☎(14) 3811-6041
e-mail: hemocentro@fmb.unesp.br

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (Grupo de Estudo – Pacientes Hepatite C)

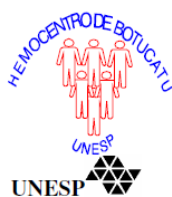
Eu, _____,

RG nº _____, telefone: _____, residente à

estou sendo convidado pelo pesquisador Prof. Paulo Eduardo de Abreu Machado, RG 2985904, a participar da pesquisa "HEPATITE C – METAPLASIA MIELÓIDE NA GÊNESE DA FIBROSE HEPÁTICA", na qual farei parte do grupo de pacientes que serão avaliados através de exames de laboratório que podem auxiliar no acompanhamento desta doença. Aceitando participar, estou ciente que doarei três amostras de sangue (5mL) para a realização dos exames, antes de iniciar meu tratamento e uma parte do material que já será colhido na biópsia, será usada neste estudo. O exame verificará células sanguíneas. Não haverá nenhuma nova intervenção exclusiva para a pesquisa. Os riscos esperados são aqueles que podem ou não acontecer após a coleta de sangue, como o aparecimento de mancha roxa no braço. O material (sangue) será utilizado exclusivamente nesta pesquisa, sendo imediatamente descartado após o uso. Os dados obtidos serão mantidos em sigilo, não sendo exposta a identificação do paciente em qualquer momento.

Assim considero-me esclarecido(a) e concordo em colaborar. Afirmando não ter sido pressionado(a) física ou psicologicamente para colaborar com a pesquisa ou assinar o presente termo, estando ciente que os responsáveis por este trabalho no Hemocentro (dados dos pesquisadores abaixo) estarão disponíveis para responder

Pesquisador:	Paulo Eduardo de Abreu Machado
Endereço:	Hemocentro de Botucatu – Distrito Rubião Júnior, s/nº Campus UNESP
Fones / e-mail:	(014) 3811-6041 hemocentro@fmb.unesp.br



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
 FACULDADE DE MEDICINA – HOSPITAL DAS CLÍNICAS
 DIVISÃO HEMOCENTRO – BOTUCATU
 DISTRITO DE RUBIÃO JÚNIOR S/Nº - BOTUCATU - SP - CEP: 18.618-000 - ☎(14) 3811-6041
 e-mail: hemocentro@fmb.unesp.br

a quaisquer perguntas ou dúvidas. O não consentimento da minha parte não interferirá na qualidade do atendimento de minha saúde. Este documento será assinado em duas vias, sendo uma para do paciente e outra arquivada pelo pesquisador.

"Qualquer dúvida adicional, você poderá entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa, através do fone: (14) 3811-6143."

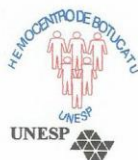
Botucatu, _____ de _____ de _____.

Doador

Paulo Eduardo de Abreu Machado
 Pesquisador

Pesquisador: **Paulo Eduardo de Abreu Machado**
 Endereço: Hemocentro de Botucatu – Distrito Rubião Júnior, s/nº Campus UNESP
 Fones / e-mail: (014) 3811-6041 hemocentro@fmb.unesp.br

B. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – Coleta de Medula Óssea



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA – HOSPITAL DAS CLÍNICAS
DIVISÃO **HEMOCENTRO – BOTUCATU**
DISTRITO DE RUBIÃO JÚNIOR S/Nº - BOTUCATU – SP - CEP: 13.618-000 - 電話(14) 3811-6041
e-mail: hemocentro@fmb.unesp.br

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (Grupo de Estudo –Doadores de medula óssea)

Eu, _____,
RG nº _____, telefone: _____, residente à

_____ estou sendo convidado(a) pela pesquisadora Caroline Mitiká Watanabe, aluna de Mestrado (RG: 46979170-6) do Curso de Pesquisa e Desenvolvimento – Biotecnologia Médica, da Faculdade de Medicina de Botucatu, a participar da pesquisa "**Hepatite C- metaplasia mielóide na gênese da fibrose hepática**", na qual farei parte do grupo de doadores de medula óssea.

Aceitando participar, estou ciente que doarei material do aspirado de medula óssea colhido no momento da doação (4mL), no Serviço de Transplante de Medula Óssea do Hospital Amaral Carvalho – Jaú - SP.

A medula óssea é composta por células sanguíneas, dentre elas os megacariócitos. Estas células serão separadas do material total e será realizado um estudo, no Hemocentro de Botucatu, para compreender melhor se elas são infectadas pelo vírus da hepatite C.

Não haverá nenhuma nova intervenção exclusiva para essa pesquisa. Os riscos esperados, que podem ou não acontecer, serão os mesmo que envolvem a doação de medula óssea, que são mínimos, sendo que o mais frequente é a dor no local da punção.

Pesquisadora: **Caroline Mitiká Watanabe**
Endereço: Hemocentro de Botucatu – Distrito Rubião Júnior, s/nº Campus UNESP
Fones / e-mail: (014) 3811-6041 Ramal 231 citometria@fmb.unesp.br
Orientador: **Prof. Dr. Paulo Eduardo de Abreu Machado**
Endereço: Hemocentro de Botucatu – Distrito Rubião Júnior, s/nº Campus UNESP
Fones / e-mail: (014) 3811-6041 Ramal 231 citometria@fmb.unesp.br



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
 FACULDADE DE MEDICINA – HOSPITAL DAS CLÍNICAS
 DIVISÃO HEMOCENTRO – BOTUCATU
 DISTRITO DE RUBIÃO JÚNIOR S/Nº - BOTUCATU – SP - CEP: 18.618-000 - ☎(14) 3811-6041
 e-mail: hemocentro@fmb.unesp.br

O aspirado de medula óssea será utilizado exclusivamente nesta pesquisa, sendo imediatamente descartado após o uso. Os dados obtidos serão mantidos em sigilo, não sendo exposta a identificação do doador em qualquer momento. Não haverá, em hipótese alguma, nenhuma necessidade de qualquer intervenção exclusiva para a pesquisa.

Assim considero-me esclarecido(a) e concordo em colaborar. Afirmo não ter sido pressionado(a) física ou psicologicamente para colaborar com a pesquisa ou assinar o presente termo, estando ciente que os responsáveis por este trabalho no Hemocentro de Botucatu (dados dos pesquisadores abaixo) estarão disponíveis para responder a quaisquer perguntas ou dúvidas. O não consentimento da minha parte não interferirá na qualidade do atendimento de minha saúde. Este documento será assinado em duas vias, sendo uma para o doador e outra arquivada pelo pesquisador.

"Qualquer dúvida adicional, você poderá entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa, através do fone: (14) 3880-1609."

Botucatu, _____ de _____ de _____.

 Doador

 Caroline Mitiká Watanabe

Pesquisadora

Pesquisadora: **Caroline Mitiká Watanabe**
 Endereço: Hemocentro de Botucatu – Distrito Rubião Júnior, s/nº Campus UNESP
 Fones / e-mail: (014) 3811-6041 Ramal 231 citometria@fmb.unesp.br
 Orientador: **Prof. Dr. Paulo Eduardo de Abreu Machado**
 Endereço: Hemocentro de Botucatu – Distrito Rubião Júnior, s/nº Campus UNESP
 Fones / e-mail: (014) 3811-6041 Ramal 231 citometria@fmb.unesp.br

C. Tampão Plaquetário: PBS-EDTANa₂ (0,07mol/L NaCl, 0,0264 mol/L Na₂HPO₄ , 0,009 mol/L Na₂EDTA)

Preparação do Tampão PBS-EDTA:

Pesar, em balança analítica, os seguintes reagentes:

4,09g de NaCl

0,049813g de Na₂HPO₄

0,0099635g de Na₂EDTA

Dissolver os reagentes em 1 litro de água destilada e deixar sob agitação até a dissociação completa dos sais. Se necessário, ajustar o pH para 7,4.

D. Preparação da solução de BSA 5%

Concentração inicial da Albumina Bovina: 22%

$$C_1 \cdot V_1 = C_2 \cdot V_2$$

$$22\% \cdot X = 5 \cdot 1$$

$$X = 5/22$$

$$X = 0,220\text{ml}$$

Solução de uso: 220 μ L de Sab 22% e 780 μ L de PBS.

E. Reagente de permeabilização Triton X-100 - 0,4%

$$C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2$$

$$100 \times V_1 = 0,4 \times 500$$

$$V_1 = 2,0\mu\text{l}$$

Solução de uso: 2 μ L de Triton X-100 para 498 μ L de água de Milli-Q.

F. Reagente de permeabilização saponina 0,2%

Para 100mL de solução de uso, pesar 0,2g de Saponina pura e acrescentar 100mL de PBS. Homogeneizar até a dissociação do sal. Armazenar em geladeira.

G. Anticoagulante CPDA-1 modificado

Preparar primeiro Solução de EDTA 6% estéril:

Para 20 mL de solução pesar 1,2 g de EDTA diidratado [C₁₀H₁₄N₂O₈Na₂.2H₂O] e acrescentar o volume de 20 mL de água mili-Q.

Deixar sob agitação para homogeneizar e autoclavar a solução. Armazenar em frasco âmbar à temperatura ambiente.

Providenciar uma 1 bolsa de coleta de sangue total contendo 63mL de CPDA-1 (Dextrose anidra USP, Citrato de sódio 2H₂O, Fosfato de sódio monobásico H₂O, Ácido cítrico, Adenina, Água q.s.p.)

Em fluxo laminar realizar os seguintes procedimentos:

- Esterilizar o manguito da bolsa com álcool 70°.
- Adicionar pelo manguito o volume de 4,9mL de EDTA 6% estéril.
- Homogeneizar e selar o manguito.
- Estocar em geladeira 6°C ± 2. Validade de 90 dias.

H. Megakaryocyte Buffer (Tampão Mk)

Pesar, em balança analítica,

4,09g de NaCl

0,049813g de Na₂HPO₄

3g de Citrato dissódico

1g de D-glicose

13,5 mL de Albumina Bovina (BSA) na concentração de 22%

1.000mL de água mili-Q q.s.p

Adicionar todos reagentes em um béquer de 1 L e deixar homogeneizando no agitador magnético.

Filtrar a solução em fluxo laminar com filtro de 0,45µm. Estocar em frasco âmbar autoclavado em geladeira 6°C ± 2. Validade da solução: 90 dias.

I. Solução de NaCl 1,5M

Para 50mL de solução pesar:

4,35 g de NaCl

Adicionar 50 mL de água Mili-Q

Homogeneizar no agitador magnético até obter uma solução homogênea.

Autoclavar e armazenar a solução em frasco âmbar à temperatura ambiente.

J. Técnica de fracionamento por gradiente descontínuo- Preparação de 10 mL de Percoll® (Sigma) com densidade de 1.055 g/mL.

Adicionar em um tubo cônico 1,5 mL de solução de NaCl 1,5M e 8,5mL de Percoll (Sigma- Aldrich ®).

Homogeneizar delicadamente por inversão.

Adicionar lentamente sob o Percoll a suspensão celular filtrada de M.O. na proporção de 1:1.

K. Tampão fosfato-salina (PBS)

Para preparação de 1L de PBS. Pesar :

8,76g de NaCl

2,84g de Na₂HPO₄

0,228g de NaH₂PO₄

1.000mL de água deionizada q.s.p

Após adicionar todos os reagentes, deixar sob agitação com barra de agitação magnético até obter uma solução homogenia.

Ajustar o pH para 7,2 - 7,4.

Transferir para o frasco âmbar e armazenar em geladeira $6^{\circ}\text{C} \pm 2$.