



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS

VANESSA ALINE BERNUSSO

**ESTUDO DO PAPEL DA ARHGAP21 DURANTE A DIFERENCIAÇÃO  
MEGACARIOCÍTICA E NO PROCESSO HEMOSTÁTICO**

CAMPINAS

2021

VANESSA ALINE BERNUSSO

**ESTUDO DO PAPEL DA ARHGAP21 DURANTE A DIFERENCIAÇÃO  
MEGACARIOCÍTICA E NO PROCESSO HEMOSTÁTICO**

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Médicas da  
Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos  
exigidos para a obtenção do título de Doutora em Ciências.

ORIENTADORA: PROFA. DRA. SARA TERESINHA OLALLA SAAD  
COORIENTADORA: PROFA. DRA. MARIANA LAZARINI

ESTE TRABALHO CORRESPONDE À VERSÃO  
FINAL DA TESE DEFENDIDA PELA ALUNA  
VANESSA ALINE BERNUSSO, E ORIENTADA PELA  
PROFA. DRA. SARA TERESINHA OLALLA SAAD

CAMPINAS

2021

Ficha catalográfica  
Universidade Estadual de Campinas  
Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas  
Maristella Soares dos Santos - CRB 8/8402

B458e Bernusso, Vanessa Aline, 1980-  
Estudo do papel da ARHGAP21 durante a diferenciação megacariocítica e no processo hemostático / Vanessa Aline Bernusso. – Campinas, SP : [s.n.], 2021.

Orientador: Sara Teresinha Olalla Saad.

Coorientador: Mariana Lazarini.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Plaquetas. 2. Diferenciação megacariocítica. 3. Citoesqueleto. 4. Proteínas rho de ligação ao GTP. I. Saad, Sara Teresinha Olalla, 1956-. II. Lazarini, Mariana, 1982-. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

**Título em outro idioma:** Study of the role of ARHGAP21 during megakaryocytic differentiation and in the hemostatic process

**Palavras-chave em inglês:**

Platelets

Megakaryocytic differentiation

Cytoskeleton

GTP binding proteins of the rho

**Área de concentração:** Fisiopatologia Médica

**Titulação:** Doutora em Ciências

**Banca examinadora:**

Sara Teresinha Olalla Saad [Orientador]

Jorg Kobarg

Nicola Amanda Conran Zorzetto

Daniela Sanchez Bassères

Luciene Borges

**Data de defesa:** 10-11-2021

**Programa de Pós-Graduação:** Fisiopatologia Médica

Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0002-8082-156X>

- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/2393290043070943>

---

# **COMISSÃO EXAMINADORA DA DEFESA DE DOUTORADO**

**VANESSA ALINE BERNUSSO**

---

**ORIENTADORA: PROFA. DRA. SARA TERESINHA OLALLA SAAD**

**COORIENTADORA: PROFA. DRA. MARIANA LAZARINI**

---

## **MEMBROS:**

**1. PROFA. DRA. SARA TERESINHA OLALLA SAAD**

**2. PROF. DR. JORG KOBARG**

**3. PROFA. DRA. NICOLA AMANDA CONRAN ZORZETTO**

**4. PROFA. DRA. DANIELA SANCHEZ BASSÈRES**

**5. DRA. LUCIENE BORGES**

---

Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia Médica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

A ata de defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertação/Tese e na Secretaria do Programa da FCM.

**Data de Defesa: 10/11/2021**

Dedico este trabalho a todos que me apoiaram e em especial aos meus pais por me fornecerem a base para adquirir o conhecimento.

## **AGRADECIMENTOS**

Aos meus pais, irmãos e amigos, pelo constante apoio, incentivo, carinho, amizade, compreensão, amor. Agradeço por compartilharem de minhas conquistas, dos momentos de incertezas e de alegria.

À orientadora Profa. Dra. Sara Saad pela oportunidade oferecida de iniciar a minha formação na pós-graduação em seu laboratório. Agradeço a compreensão, confiança, dedicação, incentivo, disponibilidade, apoio e ajuda na finalização deste trabalho. Agradeço ainda o seu incentivo em me apoiar a tomar posse e exercer como professora do ensino fundamental da Prefeitura de Campinas.

À coorientadora Profa. Dra. Mariana Lazarini pelos ensinamentos, contribuição para o desenvolvimento do projeto, pelo crescimento pessoal e profissional e ajuda na finalização deste trabalho.

Aos colaboradores Profa. Dra. Cristina Vicente, Prof. Dr. Erich De Paula, e Profa. Dra. Fabíola Mónica pelos ensinamentos, na aprendizagem das técnicas, ajuda nos experimentos e contribuição para o desenvolvimento do projeto.

À Karla Vieira que se prontificou a me ajudar com suporte intelectual e técnico. Ainda, agradeço a amizade, carinho e doação com o coração aberto e cheio de luz me proporcionando ajuda emocional no decorrer deste trabalho. Sou grata ao universo por ter colocado você em meu caminho.

À Adriana Duarte por toda a ajuda na execução dos experimentos. Agradeço a amizade, carinho e doação.

À equipe de trabalho do Laboratório de Biologia Molecular e Celular do Hemocentro que me auxiliou em diferentes momentos durante a realização deste projeto: Irene, Ana Leda, Simone, Lena, Ucha, Fernanda Niemann, Audrey, Raquel Foglio, Patrícia Juliane. Obrigada pela amizade e profissionalismo em inúmeros momentos.

Aos colegas de trabalho: Fernanda, Isabella, Mariana, Marisa, Lucas, Rubia, Andrana, Cristiane, Ada, Aline, Paula, Rodrigo, Carolina, Fernanda, Matheus, Isabela, Rita, Bruna, Flávia, Laure, Luciana, Juliana e Moisés pelo compartilhamento de ensinamentos e companhia.

Ao suporte de instituições como INFABIC, Laboratório de Microscopia Eletrônica IB e Laboratório de Genoma, os quais possibilitaram imagens de microscopia e Laboratório da Farmacologia o qual possibilitou a análise da agregação plaquetária.

Ao Márcio Alves da Cruz por toda a dedicação, cuidados e zelo com os camundongos. E um agradecimento especial aos próprios camundongos pois sem eles este trabalho não teria sido realizado.

**À agência Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) processos nº 2013/13022-2 e nº 2017/21801-2 pelo financiamento deste trabalho.**

Agradeço a Deus pela oportunidade de realizar com muito carinho e dedicação este trabalho de pesquisa e também pela oportunidade de ministrar aulas; de ter conhecido todas as pessoas aqui citadas e muitas outras; de enxergar a vida sob a suas diversas faces e sentir que tudo foi de grande valia para meu aprendizado e crescimento pessoal.

*“Somos o que pensamos. Tudo o que somos surge com nossos pensamentos. Com nossos pensamentos, fazemos o nosso mundo”*

**Buda**

## RESUMO

A reorganização do citoesqueleto mediada pela família de proteínas Rho GTPases é essencial durante a diferenciação do megacariócito e formação de plaquetas. As diferentes funções plaquetárias também dependem da intensa reorganização do citoesqueleto. As proteínas RhoGAP, como ARHGAP21, atuam como reguladores negativos de Rho GTPases, acelerando sua inativação. Nosso grupo de pesquisa reportou a participação da ARHGAP21 na regulação de funções de células-tronco e progenitores hematopoiéticos, incluindo seu comprometimento nas células progenitoras megacariocíticas. No presente estudo, investigamos o papel da ARHGAP21 na diferenciação megacariocítica e função plaquetária. Para tal, utilizamos dois modelos: 1) células de eritroleucemia humana (HEL) silenciadas para ARHGAP21 e submetidas à diferenciação megacariocítica *in vitro* e 2) camundongos heterozigotos nocautes para *Arhgap21* (*Arhgap21<sup>+/-</sup>*). Proteínas do citoesqueleto foram investigadas por microscopia confocal e western blot em células HEL silenciadas para ARHGAP21 e submetidas à diferenciação megacariocítica. Marcadores de diferenciação e ploidia foram avaliados por citometria de fluxo. O modelo de camundongo *Arhgap21<sup>+/-</sup>* foi usado para avaliar a diferenciação megacariocítica de células progenitoras primárias. O tempo de oclusão do vaso e a formação de trombo foram detectados após lesão da artéria carótida de camundongo *Arhgap21<sup>+/-</sup>* com FeCl<sub>3</sub>. Agregação plaquetária e exposição à p-selectina da *Arhgap21<sup>+/-</sup>* foram avaliados em resposta à trombina com um agregômetro. A morfologia plaquetária foi avaliada por microscopia eletrônica. A expressão da ARHGAP21 foi aumentada durante a diferenciação megacariocítica na linhagem celular e células primárias de camundongo. No modelo de células HEL, a proteína ARHGAP21 foi detectada nas protrusões citoplasmáticas colocalizada e associada à tubulina  $\alpha$  e foi detectada principalmente na fração celular proteica contendo a tubulina polimerizada. O silenciamento da ARHGAP21 diminuiu a expressão da tubulina glu, sugerindo instabilidade dos microtúbulos e maior espalhamento com aumento de protrusões celulares. Ainda, em células HEL, o silenciamento da ARHGAP21 aumentou a atividade de CDC42, enquanto não foram observadas alterações na atividade de RHOA. Em modelo de camundongo *Arhgap21<sup>+/-</sup>*, observamos aumento de agregação plaquetária *in vitro* induzida por trombina e exposição à p-selectina. Houve maior atividade de RHOA e CDC42 em células primárias da medula óssea de *Arhgap21<sup>+/-</sup>* submetidas a diferenciação megacariocítica em comparação a células selvagens. Plaquetas *Arhgap21<sup>+/-</sup>* também apresentaram aumento no tamanho de grânulos  $\alpha$ . Estes resultados foram associados com o menor tempo de sangramento caudal e aceleração de formação de trombo após injúria da artéria carótida com FeCl<sub>3</sub>. Nossos resultados indicam que ARHGAP21 é uma proteína crítica na regulação da produção e função plaquetária por meio do controle do rearranjo do citoesqueleto.

**Palavras chave:** Plaquetas. Diferenciação megacariocítica. Citoesqueleto. Proteínas rho de ligação ao GTP.

## ABSTRACT

Cytoskeleton reorganization mediated by the Rho family of GTPases is an essential part of megakaryocyte differentiation and platelet formation. The different functions of platelets also depend on the intense reorganization of the cytoskeleton. RhoGAP proteins, such as ARHGAP21, are negative regulators of Rho GTPases and accelerate their inactivation. Our research group has reported the participation of ARHGAP21 in the regulation of the functions of hematopoietic stem progenitor cells, including its involvement in megakaryocytic lineage differentiation. In the present study, we investigated the role of ARHGAP21 in megakaryocytic differentiation and platelet function. To this end, two models were used: 1) the human erythroleukemia cell line (HEL) silenced for ARHGAP21 and subjected to megakaryocytic differentiation *in vitro* and 2) heterozygous knockout mice for the *Arhgap21* gene (*Arhgap21*<sup>+/-</sup>). The HEL cell line model was used to assess cytoskeleton proteins by confocal microscopy and western blotting as well as differentiation markers and ploidy by flow cytometry. The *Arhgap21*<sup>+/-</sup> mouse model was used in different experiments to investigate megakaryocytic differentiation of primary progenitor cells. Vessel occlusion time and thrombus formation were detected after injury of carotid artery with FeCl<sub>3</sub>. *Arhgap21*<sup>+/-</sup> platelet aggregation and exposure to p-selectin in response to thrombin were obtained using an aggregometer and platelet morphology was evaluated by electron microscopy. ARHGAP21 expression was increased during megakaryocytic differentiation both in the HEL cell line and in mice primary cells. In the HEL cell line, ARHGAP21 was detected in cytoplasmic protrusions, where it colocalized and associated with  $\alpha$ -tubulin, and mainly detected in the protein cell fraction containing polymerized tubulin. In those cells, ARHGAP21 silencing decreased the expression of  $\alpha$ -tubulin suggesting microtubule instability and greater spreading with increased cell protrusions. Furthermore, ARHGAP21 silencing increased CDC42 activity in the HEL cell line, whereas no change in RHOA activity was observed. Using *Arhgap21*<sup>+/-</sup> mouse model, we observed increased platelet aggregation *in vitro* induced by thrombin and higher p-selectin exposure. There was higher RHOA and CDC42 activity in *Arhgap21*<sup>+/-</sup> bone marrow primary cells when they were subjected to megakaryocytic differentiation in comparison with wild-type cells. *Arhgap21*<sup>+/-</sup> platelets showed an increase in the size of  $\alpha$  granules. These results were associated with shorter tail bleeding time and accelerated thrombus formation after injury of carotid artery with FeCl<sub>3</sub>. Our results indicate that ARHGAP21 may be a critical protein in regulating platelet production and function through the control of cytoskeleton rearrangement.

**Key words:** Platelets. Megakaryocytic differentiation. Cytoskeleton. GTP binding proteins of the rho.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

**Figura 1.** Megacariócitos maduros na medula óssea se estendem em proplaquetas em vasos sanguíneos e geram plaquetas.

**Figura 2.** Eventos que ocorrem durante a produção de proplaquetas e liberação de plaquetas pelos megacariócitos.

**Figura 3.** Organização dos microtúbulos após a ativação plaquetária.

**Figura 4.** Composição e dinâmica dos microtúbulos.

**Figura 5.** Modelo celular demonstrando que a polimerização de actina conduz à formação de protrusão, polarização e lamelipódios.

**Figura 6.** Adesão mediada por associações representativas das integrinas e proteínas.

**Figura 7.** Regulação da atividade da proteína G.

**Figura 8.** Via de sinalização das Rho GTPases RHOA, CDC42 e RAC1/2, alguns ativadores e efetores envolvidos na reorganização do citoesqueleto durante a megacariopoiese.

**Figura 9.** ARHGAP21 é uma proteína RhoGAP.

**Figura 10.** Proteína ARHGAP21 participa de múltiplos processos celulares.

**Figura 11.** A expressão da ARHGAP21 é aumentada durante a diferenciação megacariocítica das células HEL.

**Figura 12.** ARHGAP21 e tubulina  $\alpha$  se colocam durante a diferenciação megacariocítica.

**Figura 13.** ARHGAP21 e actina F apresentam pouca colocalização durante a diferenciação megacariocítica.

**Figura 14.** ARHGAP21 associa-se com tubulina  $\alpha$  e está super expressa em extratos contendo tubulina polimerizada.

**Figura 15.** Silenciamento da ARHGAP21 mediada por oligonucleotídeos (siRNA) em células HEL.

**Figura 16.** Silenciamento da ARHGAP21 altera tubulina glu durante a diferenciação megacariocítica das células HEL.

**Figura 17.** O silenciamento da ARHGAP21 em células HEL altera a atividade de CDC42 e proteínas de adesão durante a diferenciação megacariocítica.

**Figura 18.** O silenciamento da ARHGAP21 altera a morfologia das células HEL durante a diferenciação megacariocítica.

**Figura 19.** O silenciamento da ARHGAP21 altera a morfologia das células HEL durante a diferenciação megacariocítica.

**Figura 20.** Células HEL silenciadas para ARHGAP21 apresentam aumento da área celular e mais protrusões no processo de diferenciação megacariocítica.

**Figura 21.** O silenciamento da ARHGAP21 não altera a porcentagem de células positivas para dupla marcação CD61 e CD41 na diferenciação megacariocítica das células HEL.

**Figura 22.** O silenciamento da ARHGAP21 não altera a porcentagem de células positivas para dupla marcação CD41 e CD49b na diferenciação megacariocítica das células HEL.

**Figura 23.** Diminuição da porcentagem de células positivas para CD235a nas células HEL controle e silenciadas para ARHGAP21 durante o processo de diferenciação.

**Figura 24.** Ploidia não é alterada no processo de diferenciação megacariocítica em células silenciadas para ARHGAP21 e controle.

**Figura 25.** Aumento da média da intensidade de fluorescência de CD42 para células *Arhgap21*<sup>+/-</sup> e do tipo selvagem confirma o processo de diferenciação megacariocítica.

**Figura 26.** A proteína *Arhgap21* é expressa em células primárias de camundongo durante a diferenciação megacariocítica.

**Figura 27.** Aumento da expressão e atividade de CDC42 e RHOA das células da medula óssea dos camundongos *Arhgap21*<sup>+/-</sup> em comparação com as células dos camundongos do tipo selvagem no dia zero.

**Figura 28.** Diferenciação megacariocítica das células progenitoras *Arhgap21*<sup>+/-</sup> exibem mais espalhamento na cultura em comparação com as células progenitoras do tipo selvagem.

**Figura 29.** *Arhgap21*<sup>+/-</sup> não apresenta diferença significativa nas populações CD61<sup>+</sup> CD41<sup>+</sup> e CD41<sup>+</sup>CD42<sup>+</sup> da medula óssea.

**Figura 30.** *Arhgap21*<sup>+/-</sup> não altera a quantidade de megacariócitos na MO.

**Figura 31.** *Arhgap21*<sup>+/-</sup> para UFC-Mk não apresenta diferença significativa nas populações CD61<sup>+</sup> CD41<sup>+</sup> e CD41<sup>+</sup>CD42<sup>+</sup> da MO.

**Figura 32.** Camundongos *Arhgap21*<sup>+/-</sup> exibem menor tempo de sangramento na cauda e acelerada formação de trombo após lesão arterial da carótida induzida por FeCl<sub>3</sub>.

**Figura 33.** As plaquetas *Arhgap21*<sup>+/-</sup> apresentam aumento na agregação.

**Figura 34.** As plaquetas *Arhgap21*<sup>+/-</sup> apresentam tamanho dos grânulos aumentados.

**Figura 35.** Principais achados sobre o papel da ARHGAP21 na diferenciação megacariocítica e funções plaquetárias.

## **LISTA DE TABELAS**

**Tabela 1.** Lista dos anticorpos utilizados nos ensaios de imunoprecipitação e western blotting.

**Tabela 2.** Sequência de siRNA específicos para silenciamento de ARHGAP21.

**Tabela 3.** Lista dos anticorpos utilizados nos ensaios de citometria.

## **LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

**APC** - Allophycocyanin

**ARHGAP21** – do inglês, Rho GTPase Activating Protein 21

**BSA** - Albumina sérica bovina

**C57BL/6** - Camundongos da linhagem black 6

**CDC42** – do inglês, Cell division control protein 42 homolog

**cDNA** - DNA complementar

**UFC** - unidade formadora de colônia

**UFC-Mk**- Unidade formadora de colônia megacariocítica

**CTH** - Célula tronco hematopoética

**DAPI 4'6 diamino** – 2 fenilindole

**DNA**: Ácido desoxirribonucleico

**ECL** – do inglês, Enhanced ChemiLuminescence

**EDTA** - Ethylenediamine tetraacetic acid

**ELISA** – do inglês, Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

**FAK** – Focal Adhesion kinase

**FeCl<sub>3</sub>** - Cloreto Férrico

**FITC** - Fluorescein isothiocyanate

**GDP** - Guanosina-difosfato

**GTP** – Guanosina-trifosfato

**HEL** - Célula eritroleucêmica

**IP** - Iodeto de propídeo

**MIF** – Média da intensidade de fluorescência

**Mk** - Megacariócitos

**MO** - Medula óssea

**MTT** – Methylthiazoletetrazolium

**Op18** – Estatmina

**PBS** – Tampão salino

**PDZ** – PSD-95/Discs-large/ZO-1

**PE** – Phycoeritrine

**PH** – Pleckstrin Homology

**PMA** - phorbol 12-myristate-13-acetate

**PMSF** – Fluoreto de fenilmetilsulfonila

**Rho GAP** – do inglês, Rho GTPase activating protein

**RHOA** – do inglês, Ras Homolog gene family, member A

**RHOB** – do inglês, Ras Homolog gene family, member B

**RHOC** – do inglês, Ras Homolog gene family, member C

**RNA** - Acido Ribonucleico

**RNA<sub>m</sub>** - Acido Ribonucleico mensageiro

**RPM** - Rotações por minuto

**RT-PCR** - do inglês, Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction

**SDF-1**- Fator derivado de células estromal-1

**SFB** - Soro fetal bovino

**siRNA** – do inglês, RNA de interferência

**SMI** – Sistema de membrana invaginada

**TBS-T** – Tampão Tris-salino adicionado de Tween- 20

**TPO** - Trombopoietina

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>19</b>
1.1. Biogênese das plaquetas .....	20
1.2. Papel do citoesqueleto nas plaquetas e megacariócitos .....	23
1.3. A família de proteínas G e Rho GTPases .....	29
1.4. A proteína RhoGAP ARHGAP21 .....	32
<b>2. OBJETIVOS .....</b>	<b>37</b>
2.1. Objetivos gerais .....	37
2.2. Objetivos específicos .....	37
<b>3. METODOLOGIA.....</b>	<b>38</b>
3.1. Diferenciação megacariocítica da linhagem celular HEL .....	38
3.2. Imunofluorescência e microscopia confocal.....	38
3.3. Imunoprecipitação e western blotting.....	39
3.4. Silenciamento da ARHGAP21 usando siRNA.....	42
3.5. Ensaio de polimerização de tubulina e actina .....	42
3.6. Análise de DNA de megacariócitos.....	43
3.7. Ensaio de ativação RHOA e CDC42.....	43
3.8. Camundongos Arhgap21 <sup>+/-</sup> .....	44
3.9. Análise da população megacariocítica Arhgap21 <sup>+/-</sup> .....	44
3.10. Diferenciação megacariocítica in vitro de células primárias murinas .....	45
3.11. PCR quantitativo.....	45
3.12. Ensaio de colônias de megacariócitos UFC-Mk murinos.....	46
3.13. Preparação de plaquetas.....	46
3.14. Ensaio de agregação plaquetária.....	47
3.15. Determinação da exposição de superfície da p-selectina.....	47
3.16. Microscopia eletrônica de transmissão .....	47
3.17. Ensaio de sangramento da veia na cauda.....	48
3.18. Avaliação da oclusão da artéria carótida e formação de trombo .....	48
3.19. Análise estatística.....	49
<b>4. RESULTADOS .....</b>	<b>50</b>

<b>PARTE 1. Estudo do papel da ARHGAP21 durante a diferenciação megacariocítica <i>in vitro</i>.....</b>	<b>50</b>
4.1. A expressão da ARHGAP21 aumenta durante a diferenciação megacariocítica das células HEL, concomitante às alterações do citoesqueleto .....	50
4.2. ARHGAP21 se localiza e interage com tubulina alfa, e altera a expressão da tubulina glu durante a diferenciação megacariocítica de células HEL .....	52
4.3. A inibição de ARHGAP21 foi efetiva em células induzidas à diferenciação megacariocítica .....	55
4.4. Silenciamento da ARHGAP21 altera proteínas que regulam os microtúbulos durante a diferenciação megacariocítica .....	55
4.5. O silenciamento da ARHGAP21 aumenta a atividade de CDC42 e altera proteínas de adesão durante a diferenciação megacariocítica.....	56
4.6. Células HEL silenciadas para ARHGAP21 apresentam aumento de área, polaridade e protrusões durante a diferenciação megacariocítica.....	59
<b>PARTE 2. Estudo do papel da ARHGAP21 durante a diferenciação megacariocítica <i>ex vivo</i> .....</b>	<b>66</b>
4.7. Células da medula óssea de camundongos <i>Arhgap21<sup>+/-</sup></i> submetidas à diferenciação megacariocítica apresentam maior espalhamento na cultura <i>in vitro</i> .....	66
<b>PARTE 3. Estudo do papel da ARHGAP21 no processo hemostático <i>in vivo</i> .....</b>	<b>73</b>
4.8. Camundongos <i>Arhgap21<sup>+/-</sup></i> apresentam menor tempo de sangramento na cauda e acelerada oclusão da artéria carótida .....	73
4.9. Plaquetas de camundongos <i>Arhgap21<sup>+/-</sup></i> apresentam aumento da agregação e tamanho dos grânulos .....	74
<b>5. DISCUSSÃO .....</b>	<b>76</b>
<b>6. CONCLUSÃO.....</b>	<b>80</b>
<b>7. REFERÊNCIAS .....</b>	<b>82</b>
<b>8. ANEXOS .....</b>	<b>92</b>
8.1. Anexo I .....	92
8.2. Anexo II .....	93
8.3. Anexo III.....	94

## 1. INTRODUÇÃO

No indivíduo adulto, a medula óssea (MO) é o principal microambiente onde as células-tronco hematopoéticas (CTHs) residem, são mantidas e se diferenciam nas linhagens sanguíneas (1). Estes microambientes (ou nichos) são compostos por diferentes tipos de células, como células hematopoiéticas em diferentes estágios de maturação, osteoblastos, células endoteliais, fibroblastos, adipócitos, células reticulares e células endoteliais, que produzem componentes de matriz extracelular e são essenciais para a homeostase da medula óssea (2).

Estudos recentes têm confirmado que a maioria das CTHs se localizam adjacente aos vasos sanguíneos sinusoidais, com uma proporção menor próxima as arteríolas (3,4). Junto com osteoblastos e células mesenquimais, as células endoteliais secretam fatores que promovem a manutenção das CTHs. Ao longo da diferenciação, as CTHs sofrem divisão assimétrica, perdem a capacidade de autorrenovação e capacidade de multipotente à medida que se comprometem a se tornarem células funcionalmente maduras de determinada linhagem, e a organização do citoesqueleto tem papel importante na decisão da diferenciação celular (5).

O sangue contém diferentes tipos celulares, incluindo os glóbulos vermelhos (eritrócitos), glóbulos brancos (leucócitos) e plaquetas (6). As plaquetas são conhecidas por seu papel no processo de interrupção da hemorragia após lesão vascular e participam de outros processos biológicos como angiogênese, cicatrização de feridas, tumorigênese e resposta a vírus e outros patógenos (7–9).

A função plaquetária inclui uma complexa interação de moléculas de adesão e sinalização (10). Quando a parede do vaso está danificada, as plaquetas são recrutadas da circulação para a matriz subendotelial, formando um tampão hemostático e subsequente formação de trombo para conter a perda sanguínea. A imobilização de plaquetas em locais de lesão vascular exige adesão das proteínas da matriz subendotelial e receptores de plaquetas (adesão vaso e plaquetas), ativação, secreção de grânulos e agregação plaquetária (interações entre as plaquetas) (11).

Quando o endotélio é lesado, as plaquetas atingem os tecidos subendoteliais e esse recrutamento seletivo é orquestrado pelas interações adesivas iniciais, desencadeando uma série de mudanças morfológicas e funcionais nas plaquetas,

conhecidas como ativação plaquetária (12). As plaquetas mudam da forma discóide para forma esférica contendo extensos prolongamentos, os chamados pseudópodes em sua superfície. Agonistas como a trombina induzem a mudança de forma e rearranjo do citoesqueleto plaquetário (13,14). Após a adesão e alteração de morfologia, as plaquetas começam a descarregar o conteúdo de seus grânulos (degranulação) na área circundante, ocorre o espalhamento, resultando no recrutamento adicional de plaquetas e interações com outros componentes do sangue (12).

As plaquetas possuem os grânulos densos e os grânulos alfa. Os grânulos densos contêm algumas proteínas, íons  $\text{Ca}^{2+}$  e metabólitos, como nucleotídeos, histamina e serotonina (15), e os grânulos alfa ( $\alpha$ ) contêm diversas quimiocinas, moléculas (anti) angiogênicas, fatores de crescimento e moléculas pró e antitrombóticas (16,17). Glicoproteínas, como a p-selectina (CD62P), são exclusivamente localizadas na membrana do grânulo  $\alpha$  de plaquetas em repouso. Após a secreção do grânulo  $\alpha$ , a membrana do grânulo se funde com o membrana plasmática da plaqueta e expõe CD62P nas superfície, mediando interações de plaquetas e leucócitos ao endotélio vascular (18).

A ativação plaquetária é dependente da rápida dinâmica dos microtúbulos e filamentos de actina que compõem o citoesqueleto para permitir as enormes mudanças morfológicas e secreção de substâncias de seus grânulos intracelulares. Portanto, a compreensão do papel do citoesqueleto de tubulina e actina neste processo é necessária para o entendimento do papel das plaquetas em funções biológicas vitais.

### **1.1. Biogênese das plaquetas**

As plaquetas são liberadas a partir da fragmentação citoplasmática de grandes células da MO denominadas megacariócitos (Mk), que, como outras células hematopoiéticas maduras, são geradas a partir da diferenciação de CTHs. Megacariócitos estão intimamente associados a sinusóides por toda a medula óssea (19).

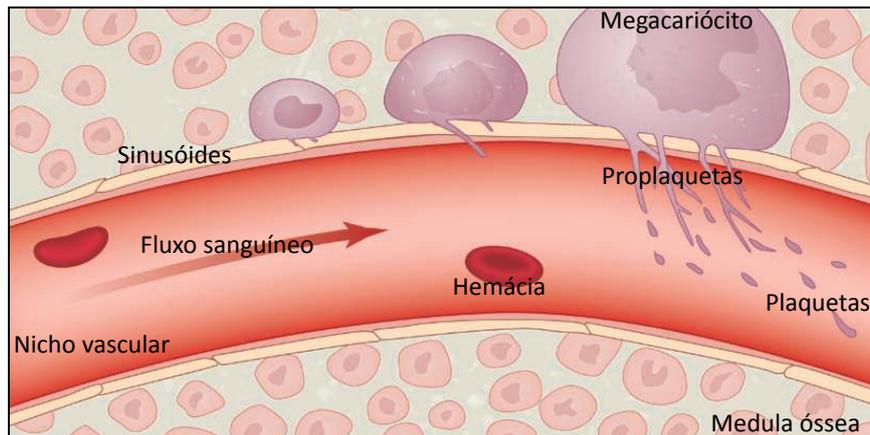
A megacariopoiese é rigidamente regulada por uma série de fatores de crescimento e citocinas para manutenção de um número adequado de plaquetas circulantes (19). Células do microambiente da medula óssea regulam este processo

através da produção de citocinas, receptores para integrina, moléculas de adesão de superfície de células hematopoéticas (20).

O principal regulador sinalizador da megacariopoiese é trombopoetina (TPO), e citocinas como interleucina-3 (IL-3) e fator de células tronco (SCF) são importantes durante os estágios iniciais da expansão das células progenitoras megacariocíticas (21). A sinalização celular iniciada pela trombopoietina promove a ligação de TPO ao seu receptor c-Mpl (22) e resulta na ativação da quinase de adesão focal (FAK) e outras proteínas efetoras (21). A FAK é um mediador de adesão da célula a componentes de matriz extracelular, influenciando na diferenciação de megacariócitos. As integrinas atuam como receptores na matriz extracelular (23). A adesão do megacariócito ao fibrinogênio, fibronectina ou ao fator de von Willebrand promove a formação de plaquetas, enquanto a presença do colágeno tipo I inibe a produção plaquetária. Além disso, TPO promove o amadurecimento do megacariócito pela replicação do DNA, sem haver divisão nuclear ou citoplasmática, aumentando o conteúdo do seu citoplasma e poliploidia celular (32-128N), processo chamado de endomitose (20).

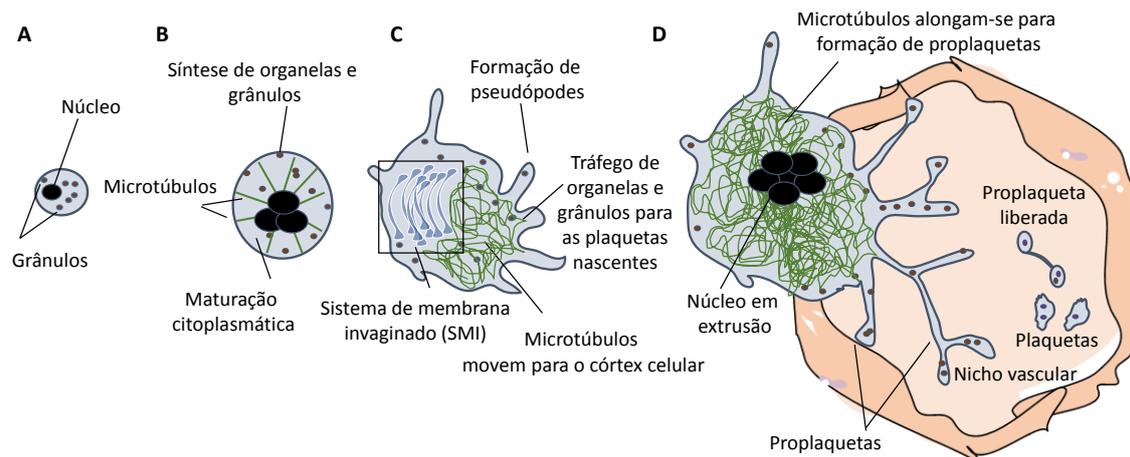
Ao longo do processo de diferenciação de megacariócitos ocorre o desenvolvimento de uma rede única de canais de membrana conhecida como sistema de membrana invaginada (SMI). Acredita-se que o SMI seja responsável pela formação da membrana plasmática das futuras plaquetas (24,25). Uma vez maduros, os megacariócitos migram para a vasculatura onde interagem com as células endoteliais da medula óssea (22).

O mecanismo subjacente à migração de megacariócitos em direção à vasculatura é desconhecido, mas o fator-1 derivado de células do estroma (SDF-1) parece fornecer o sinal do direcionamento. SMI estende protrusões, conhecidas como proplaquetas em vasos sinusóides da MO (26). As proplaquetas são finalmente fragmentadas em plaquetas individuais na corrente sanguínea e o núcleo do megacariócito é extrudado e fagocitado após ser totalmente convertido em proplaquetas (24). (Figura 1)



**Figura 1. Megacariócitos maduros na medula óssea se estendem em proplaquetas em vasos sanguíneos e geram plaquetas.** Adaptado de Deborah L French (27).

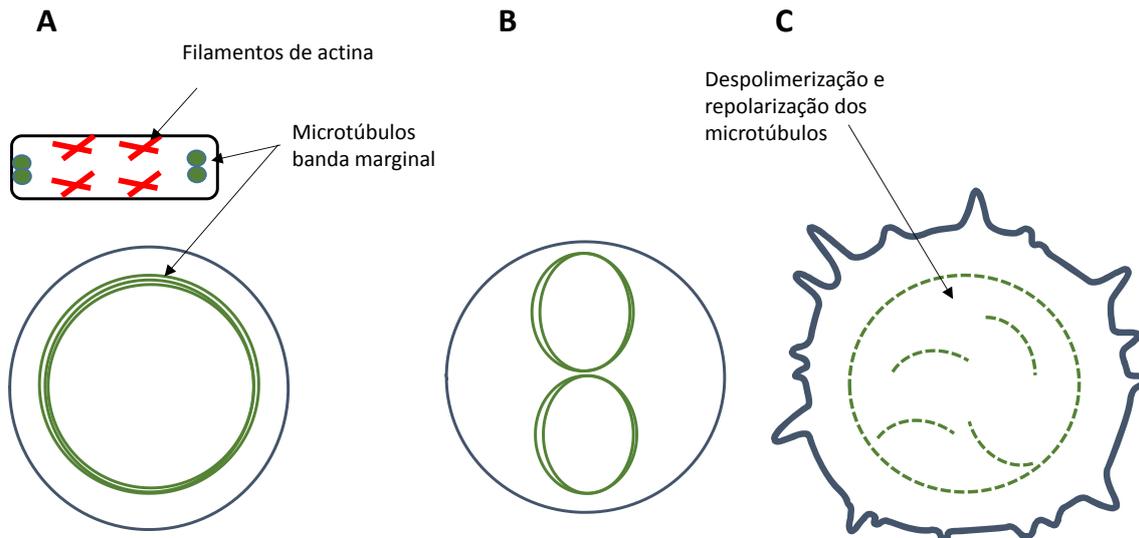
A produção de proplaquetas se inicia com a erosão de um dos pólos do megacariócito e gera grandes estruturas alongadas e finas com delgadas projeções tubulares (Figura 2A-D). Este processo é altamente dependente de uma complexa rede de filamentos de proteínas, dos quais os principais componentes são tubulina e actina. Microtúbulos se alinham em feixes e translocam para o córtex dos megacariócitos (Figura 2B) e uma rede tubular interligada por cisternas representa um sistema canalizado para a liberação de proplaquetas (28). Neste momento, ocorre a formação de pseudópodes na membrana plasmática e o citoesqueleto de tubulina providencia a distribuição dos grânulos e organelas para as proplaquetas nascentes (Figura 2C). Microtúbulos preenchem o eixo e o córtex dos pseudópodes, que saem em forma de uma alça e entram novamente no eixo, formando uma espécie de “broto” na ponta das proplaquetas, que ao amadurecerem se desprendem destes prolongamentos, originando as plaquetas (Figura 2D). Estima-se que milhares de plaquetas sejam liberadas do megacariócito por meio de uma série coordenada de eventos complexos que ainda não estão totalmente compreendidos (29).



**Figura 2. Eventos que ocorrem durante a produção de proplaquetas e liberação de plaquetas pelos megacariócitos.** (A) Megacariócitos imaturos passarão por endomitose nuclear. (B) Antes do início da formação das proplaquetas, ocorre a maturação citoplasmática, síntese de organelas e grânulos e os microtúbulos translocam para o córtex celular. (C) Sistema de membrana invaginado (SMI) fornece um reservatório de membranas para o crescimento das proplaquetas e microtúbulos preenchem os pseudópodes. Nesta etapa ocorre o tráfego de organelas e grânulos para as futuras plaquetas nascentes. (D) O deslizamento de microtúbulos impulsiona a formação das proplaquetas e as organelas são levadas até a extremidade. Ocorre a extrusão do núcleo e as proplaquetas são liberadas para a corrente sanguínea até a formação total das plaquetas. Note a intensa reorganização do citoesqueleto durante este processo de diferenciação megacariocítica e formação de plaquetas. Adaptado de John H Hartwig e Joseph E Italiano Jr (30) e Patel SR et al. (31).

## 1.2. Papel do citoesqueleto nas plaquetas e megacariócitos

Nas plaquetas não ativadas, os microtúbulos formam um anel circunferencial, a chamada banda marginal, o que confere sua forma discóide. Este anel é também responsável por alterações na morfologia plaquetária após a ativação, ao passo que a matriz de actina é espalhada por toda a plaqueta (Figura 3A) (32). Após a ativação, mudanças na localização e organização do microtúbulo permitem a transição da forma discóide para forma esférica, e bobinas de microtúbulos são comprimidas para o centro das plaquetas (Figura 3B). Proteínas motoras participam da fragmentação, despolimerização e repolarização dos microtúbulos, resultando na mudança morfológica para forma esférica (Figura 3C). A actina F é a força motriz para a mudança na forma das plaquetas, disseminação e contração durante a ativação plaquetária (33,34), entretanto o seu mecanismo de atuação na ativação plaquetária ainda não é bem compreendido.



**Figura 3. Organização dos microtúbulos após a ativação plaquetária.** (A) Apresenta a forma esférica da plaqueta contendo os filamentos de actina e microtúbulos na banda marginal. (B) Na ativação da plaqueta, ocorre o enrolamento dos microtúbulos na parte central. (C) Subsequentemente a ativação, há a despolimerização e repolarização dos microtúbulos. Adaptado de Cuenca-Zamora EJ et al. (35).

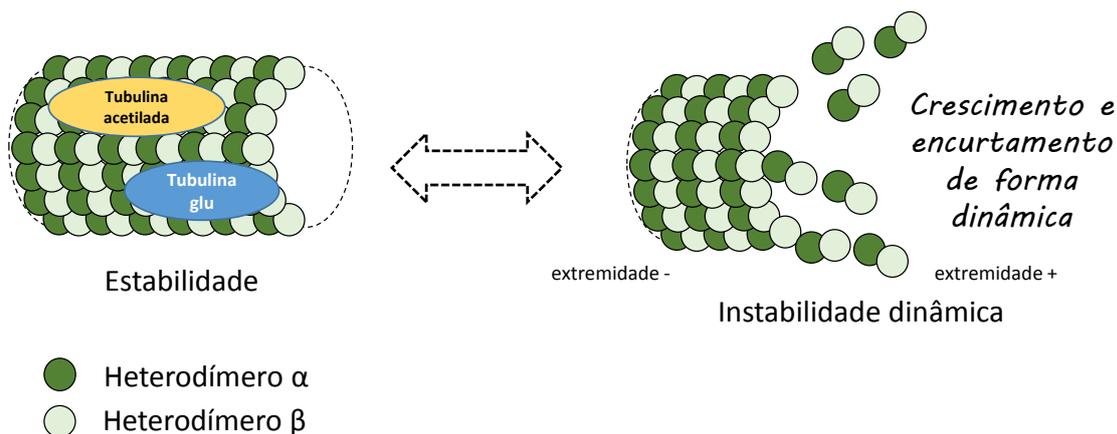
Os microtúbulos são tubos ocos formados pelos heterodímeros  $\alpha$  e  $\beta$  de tubulina, montados em protofilamentos, orientados para terminar com a subunidade  $\beta$  da tubulina, chamado de "extremidade positiva", e uma extremidade que termina pela subunidade  $\alpha$ , chamado de "extremidade negativa". Os microtúbulos aumentam ou diminuem conforme ocorre a incorporação ou liberação de heterodímeros de tubulina, sendo a incorporação mais rápida no lado "positivo" do protofilamento. O equilíbrio dinâmico da formação de microtúbulos ocorre através da remoção ou adição de dímeros de tubulina, enquanto o início e o alongamento das proplaquetas seguem com agrupamento de microtúbulos. As fases de alongamento podem ser seguidas por pausas ou fases de despolimerização rápida, chamadas de "catástrofes", nas quais é detectado um encolhimento de microtúbulos. Eventualmente essa catástrofe é "resgatada", passando do encolhimento para o crescimento dos microtúbulos. Esse comportamento de comutação, conhecido como instabilidade dinâmica (Figura 4), é necessário para a extensão de proplaquetas (36,37).

A tubulina, como a maioria das proteínas, pode sofrer modificações pós-traducionais, que geram diversidade de microtúbulos. As modificações pós-traducionais são processos dinâmicos e frequentemente reversíveis de uma proteína que induz alterações em seu funcionamento, sendo mais relevantes a acetilação e destirosinação.

Microtúbulos estáveis são caracterizados por acetilação da tubulina  $\alpha$  com a adição de um grupo químico acetila na posição 40 (38) e destirosinação (ou presença da tubulina glu), enquanto os microtúbulos dinâmicos são tirosinados (39–41).

A destirosinação da tubulina consiste na remoção da tirosina C-terminal para expor um glutamato no C-terminal recém-formado. As Tubulina Carboxipeptidases (TCP), que clivam a tirosina terminal, são duas proteases chamadas vashoibinas (VASH1 / VASH2) e em complexo com uma pequena proteína SVBP, atua como uma subunidade estabilizadora. A destirosinização da tubulina pode ser revertida pela enzima Tubulina Tirosina Ligase (TTL), controlando o ciclo de destirosinação / tirosinação. O estado de tirosinização dos microtúbulos também pode afetar a ligação às proteínas motoras, algumas cinesinas ligam-se melhor aos microtúbulos destirosinados, enquanto a dineína exibe preferência aos microtúbulos tirosinados (42,43).

A estatmina, também conhecida como oncoproteína 18 (Op 18), é uma proteína desestabilizadora de microtúbulos que promove a despolimerização de microtúbulos sequestrando heterodímeros de tubulina e aumentando a catástrofe de microtúbulos. A atividade de despolimerização da estatmina é desligada pela fosforilação nos resíduos de serina 16 (44). Rubin Camelia e colaboradores propuseram que a estatmina é necessária para a proliferação e diferenciação de megacarioblastos iniciais e sua supressão nos estágios posteriores de maturação megacariocítica é necessária para a poliploidização (45).

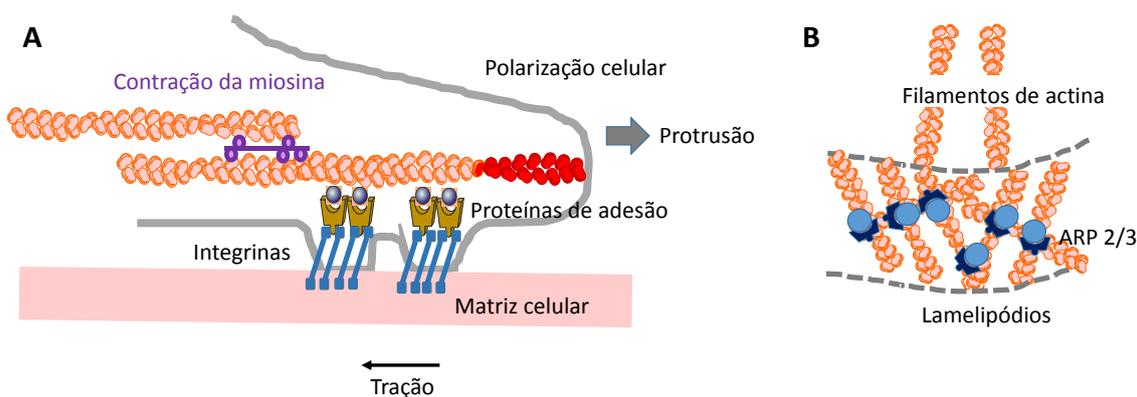


**Figura 4. Composição e dinâmica dos microtúbulos.** Microtúbulos são formados pelos heterodímeros  $\alpha$  e  $\beta$  de tubulina, em amarelo representando a tubulina acetilada e em azul representando a tubulina glu (destirosinação). O comportamento de crescimento e encurtamento de microtúbulos, é dependente da dinâmica dos microtúbulos e apresenta a "instabilidade dinâmica", um importante processo para ativação plaquetária e biogênese de plaquetas.

Alterações moleculares no gene tubulina  $\beta 1$ , tubulina  $\alpha$  e modificações pós-traducionais dos microtúbulos podem resultar em alterações no número de plaquetas, morfologia ou função. Camundongos ausentes para a isoforma da tubulina  $\beta 1$  apresentaram defeitos na geração de proplaquetas, redução na produção de plaquetas, tempo de sangramento prolongado e plaquetas com morfologia arredondada. O papel essencial da tubulina  $\beta 1$  em megacariócito já é bem descrito (46), no entanto, isoformas de tubulina  $\alpha$  também são expressas em megacariócitos e plaquetas (35,41). Recentemente, foi demonstrado que a expressão da isoforma tubulina  $\alpha 4A$  aumenta durante a diferenciação de megacariócitos, de forma semelhante a tubulina  $\beta 1$ . Além disso, camundongos com mutação para tubulina  $\alpha 4A$  apresentaram número reduzido de microtúbulos e banda marginal desordenada, defeitos na maturação de megacariócitos e na formação de proplaquetas (41).

Assim como os microtúbulos, os microfilamentos de actina são componentes essenciais do citoesqueleto. A formação de protrusão celular é dependente do córtex rico em actina. Forças mecânicas são geradas no córtex pela contração da miosina que impulsiona a célula para formar a protrusão e, por sua vez, depende da adesão firme na matriz celular estabelecidas pelas adesões focais e integrinas (47,48). Durante os processos de migração celular e espalhamento na superfície, a borda anterior impulsiona a célula para a frente, que estica o córtex de actina e ocorre a retração corpo traseiro proporcionado pela atividade da miosina. Conforme a célula avança, novos pontos de ancoragem são estabelecidos e transmitem as forças de tração necessárias para o movimento ocorrer (Figura 5A). Todas essas etapas são controladas por vias de sinalização e constante interferência dos filamentos de actina e microtúbulos para coordenar a dinâmica da migração celular (49).

A projeção do citoesqueleto de actina F na borda da célula (chamado de lamelipódio) é regulada por um grande número de proteínas de ligação como complexo Arp2/3 (Figura 5B), sendo a sua dinâmica dependente da coordenação da miosina que se liga aos filamentos de actina, que por sua vez é regulada pela fosforilação reversível da cadeia leve da miosina (MLC) e gera força para contração (50). Nos megacariócitos, a actina F é importante para a formação do SMI, pois fornece forças que acionam invaginações na membrana plasmática e coordena a ramificação das proplaquetas pela partição da membrana e as direciona aos sinusóides da MO (31,33,51).

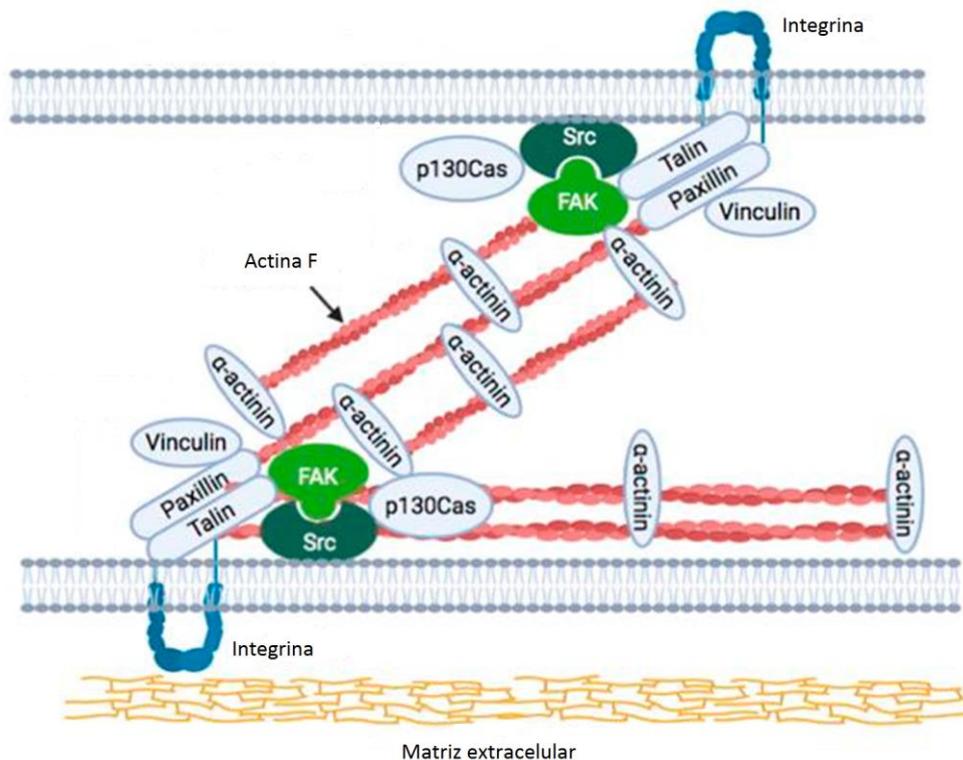


**Figura 5. Modelo celular demonstrando que a polimerização de actina conduz à formação de protrusão, polarização e lamelipódios.** (A) Forças geradas no córtex rico em actina impulsionam a célula para frente e a contração actina-miosina promove a disseminação e migração na matriz celular. (B) Estruturas dinâmicas da borda formam os lamelipódios, conectadas por proteínas de ligação do complexo Arp 2/3. Adaptado de Revathi Ananthakrishnan et al (52).

As interações entre célula e matriz extracelular são essenciais para regular o comportamento da célula, o desenvolvimento múltiplo e homeostático (53). Para desempenhar suas diversas funções, as adesões celulares se reúnem em grandes complexos de proteínas, realizado pela adesão de integrinas às adesões focais, que fornecem acoplamento mecânico entre o microambiente externo e o citoesqueleto intracelular (54,55). A integrina  $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$  estimula de fora para dentro vias de sinalização que levam à ativação e disseminação das plaquetas (56), e através de suas curtas caudas intracelulares interagem com várias proteínas, as quais estão associadas ao citoesqueleto de actina F (47).

Nos megacariócitos, a actina F coordena a formação de pseudópodes, chamados de podossomos, que promovem a adesão à matriz extracelular, a degradação da matriz, o espalhamento na superfície e a migração (36). A estabilidade e dinâmica dos podossomos depende da geração de forças de protrusão proporcionada pela associação das proteínas talina, vinculina, paxilina, actinina  $\alpha$ , zyxin e contração da miosina (57,58) e sinalização como a FAK e Src (59) (Figura 6). Forças geradas pela contração da miosina induz mudanças conformacionais expondo locais de ativação e a talina se associa a vinculina quando esticada mecanicamente. Esta associação é necessária para ativar p130CAS e paxilina no processo de protrusão e retração celular, atuando na

remodelação do citoesqueleto de actina (60) (Figura 6). Além disso, a zyxin se associa e se dissocia de adesões em resposta a forças extracelulares (61) e a FAK atua na polaridade e migração celular (62,63).

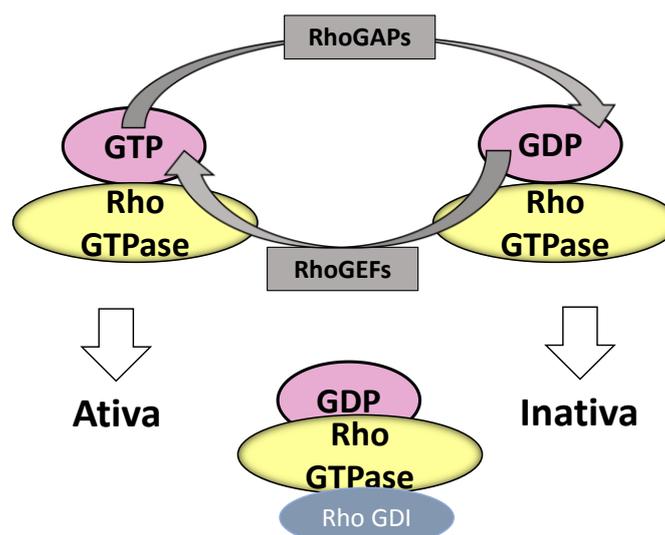


**Figura 6. Adesão mediada por associações representativas das integrinas e proteínas.** As integrinas estão ligadas à matriz extracelular e ao citoesqueleto de actina por meio de várias moléculas, incluindo talina, vinculina, actinina  $\alpha$ , FAK, paxilina, Src e p130CAS. Adaptado de Kazuo Katoh et al (62).

Sabe-se que a proteína FAK está ancorada na célula por meio de múltiplos locais, incluindo interações diretas com lipídios de membrana e proteínas de adesão que se ligam ao citoesqueleto de actina. Acredita-se que a contração da miosina possa causar o estiramento e consequente ativação da proteína FAK. A região carboxi-terminal da FAK interage com o domínio SH3 da p130Cas (64) e com os domínios SH3 das proteínas ativadoras de Rho GTPase (65,66). O extremo da região carboxi-terminal compreende o domínio FAT onde interage com outras proteínas de adesão focal, como a paxilina (67) e talina (68). A fosforilação da FAK pode mediar a disseminação de plaquetas por meio da actinina  $\alpha$ , que se localiza com uma série de proteínas do citoesqueleto, incluindo vinculina e zyxin, sendo essencial para a organização do citoesqueleto de actina (21,69).

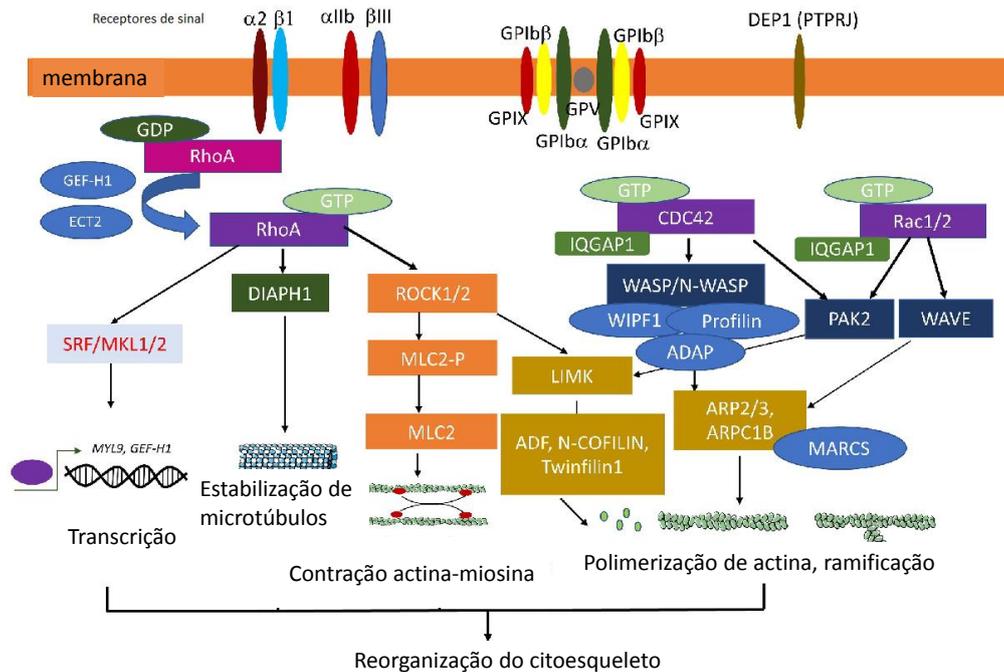
### 1.3. A família de proteínas G e Rho GTPases

Diversas funções fisiológicas celulares podem ser controladas por proteínas G, também denominadas proteínas triméricas de ligação a GTP. Proteínas G pertencem a uma classe de proteínas envolvidas na transdução de sinais celulares. Quando há um sinal extracelular, a proteína G sofre alteração conformacional capaz de ativar uma de suas subunidades que possui ligação a GTP, alternando-se entre um estado de ligação com uma guanosina difosfato inativa (GDP) para a outro com uma guanosina trifosfato ativa (GTP). As pequenas GTPases monoméricas (também chamadas de *proteínas monoméricas de ligação a GTP*) auxiliam na transmissão de sinais de muitas classes de receptores de superfície celular. As proteínas reguladoras específicas GAPs e GEFs controlam a ativação de ambos os tipos de proteínas através de sua ligação a GTP. As proteínas de ativação da GTPase (GAPs) convertem as proteínas a um estado “inativado” pelo aumento da taxa de hidrólise do GTP. Ao contrário, os fatores de troca de nucleotídeos de guanina (GEFs) ativam as proteínas de ligação a GTP por estimular a liberação do GDP, o que permite a ligação de um novo GTP. Além de RhoGEFs e RhoGAPs, o ciclo de ativação das Rho GTPases pode ser regulado pelos inibidores de dissociação de guanina GDIs, que formam complexos solúveis na tentativa de inibir a ativação aberrante das Rho GTPases (Figura 7) (70–72).



**Figura 7. Regulação da atividade da proteína G.** Este ciclo é regulado por RhoGAPs que inativam Rho GTPases e Rho GEFs que ativam Rho GTPases. RhoGDIs se ligam a Rho GTPases associadas a GDP.

As proteínas Rho GTPases são reguladoras mestras da organização do citoesqueleto, participando de uma variedade de funções celulares envolvidas na biogênese plaquetária, como tráfego de vesículas, morfogênese celular, polaridade, adesão e migração (37). Rho GTPases são pequenas proteínas (20-25 kDa) pertencentes a superfamília de proteínas Ras, encontradas em todas as células eucarióticas (73). Uma vez ativadas, as Rho GTPases ligam-se a uma variedade de efetores, incluindo proteínas quinases e reguladores de actina e tubulina. As Rho GTPases mais bem caracterizadas são RHOA, RAC1 e CDC42, cuja ativação está associada com a formação de fibras de estresse, lamelipódios e filopódios, respectivamente (74). Através deste papel na dinâmica do citoesqueleto, as Rho GTPases são importantes reguladoras na diferenciação de megacariócitos e formação de plaquetas, regulando níveis transcricionais, estabilização de microtúbulos, contração da actina-miosina, polimerização de actina e ramificação que atuam em conjunto no processo de reorganização do citoesqueleto. O efetor DIAPH1 regula funções dos microtúbulos. CDC42 ativa o complexo ARP2 / 3 por meio do WASP e RAC1 / RAC2 também ativam o complexo ARP2 / 3 por meio de outros membros da família WASP (proteínas WAVE / SCAR). CDC42 e RAC1 / 2 compartilham PAKs como efetores comuns. A ativação de PAKs induz a fosforilação de LIMK que inativa a família de proteínas cofilinas envolvido na desmontagem do filamento de actina. LIMK também são ativados pelas vias RHOA /ROCK. RHOA, RAC1 e CDC42 controlam a atividade transcricional (Figura 8) (75).



**Figura 8.** Via de sinalização das Rho GTPases RHOA, CDC42 e RAC1/2, alguns ativadores e efetores envolvidos na reorganização do citoesqueleto durante a megacariopoiese. Adaptado de William Vainchenker (75).

RHOA desempenha papel essencial na alteração da forma da plaqueta através da proteína RHO associada à quinase (ROCK), por estimular a fosforilação da cadeia leve da miosina (MLC) e regular eventos contráteis da actina e miosina (76,77); enquanto a proteína ROCK ao fosforilar a cofilina, acelera a dissociação dos filamentos de actina (78). Camundongos com deficiência para RHOA apresentaram macrotrombocitopenia com redução de aproximadamente 50% no número de plaquetas e aumento do tempo de sangramento caudal em comparação a camundongos do tipo selvagem.

A Rho GTPase CDC42 apresenta papel importante na migração de grânulos e organelas para proplaquetas e regulação da secreção de grânulos em plaquetas quando induzidas por agonistas. Em camundongos condicionados para a deficiência de CDC42, as plaquetas apresentaram secreção aumentada de grânulos alfa, leve trombocitopenia, pequeno aumento de tamanho, aumento de agregação plaquetária e oclusão (79). Ainda, a deficiência funcional de CDC42 prejudicou a formação transendotelial da proplaqueta (80).

As Rho GTPases RHOA e CDC42 apresentam sinalização durante a biogênese plaquetária (81). Megacariócitos polarizam o SMI como pré-requisito para a liberação direcionada de proplaquetas nos vasos sinusoidais (80). CDC42 atua como um regulador positivo da formação de SMI e proplaquetas (36,80,81), e na polarização do megacariócito, a ausência da atividade de RHOA aumenta a atividade de CDC42 e, direciona os megacariócitos nos locais de protrusão celular para a formação de plaquetas.

Estudos funcionais com plaquetas murinas mostraram que RAC1 tem participação na formação de lamelipódios (82). Megacariócitos com dupla inibição de CDC42 e RAC1 apresentaram macrotrombocitopenia, morfologia plaquetária anormal e defeitos na dinâmica dos microtúbulos durante a produção de proplaquetas (73).

Recentemente, um trabalho utilizando camundongos nocautes com dupla inibição para RHOA e CDC42 em megacariócitos e plaquetas mostrou que essas Rho GTPases são dispensáveis para a poliploidização e essencial para a maturação citoplasmática, que desempenha papel importante nas fases finais da diferenciação. A dupla inibição alterou a dinâmica da actina F e microtúbulos, inibiu a formação de proplaquetas e induziu acentuada macrotrombocitopenia (83).

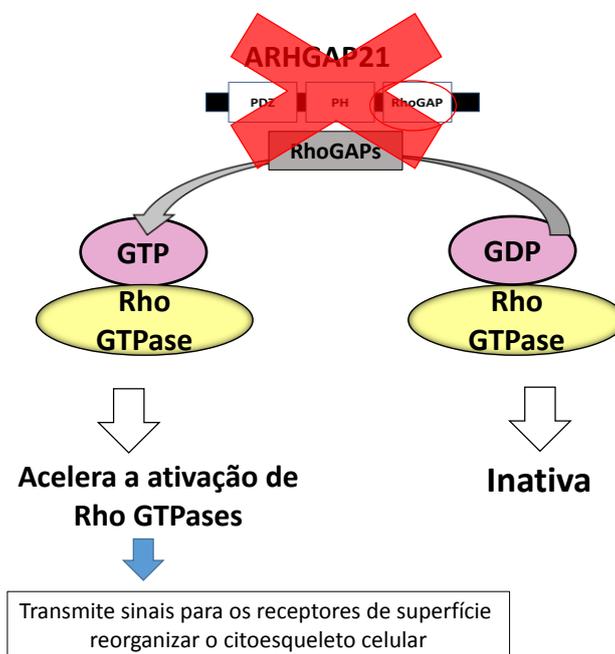
Portanto, o desenvolvimento de megacariócitos e formação de plaquetas são controlados pelos rearranjos do citoesqueleto e sinalização de diversas proteínas celulares, guiado por alterações na atividade de Rho GTPases. As vias de sinalização “upstream” que regulam as Rho GTPases na sinalização em megacariócitos são apenas parcialmente compreendidas. Nesse contexto, presumimos que a proteína ARHGAP21, uma reguladora da atividade de Rho GTPase, poderia estar envolvida na diferenciação de megacariócitos e na formação e função plaquetária.

#### **1.4 A proteína RhoGAP ARHGAP21**

A proteína ARHGAP21 foi descrita pelo nosso grupo em 2002 (84) e desde então a caracterização do seu papel funcional tem sido uma das linhas de pesquisa em pleno desenvolvimento no laboratório de Biologia Molecular da UNICAMP/Hemocentro. Até o momento, nosso grupo de pesquisa publicou 10 trabalhos de um total de 21 trabalhos descrito no banco de dados do *Pubmed.gov*.

ARHGAP21 vem ganhando notoriedade como uma das proteínas com diversos papéis funcionais, inclusive como alvo terapêutico em neoplasias e hematopoiese.

ARHGAP21 é uma proteína com um domínio PDZ na região amino-terminal, um domínio PH (homólogo à Pleckstrina) na região central e um domínio RhoGAP na região carboxi-terminal. Domínios PH podem ligar-se a lipídeos de fosfatidilinositol dentro da membrana plasmática e proteínas G (85). Por meio dessas interações, os domínios PH associam-se a proteínas envolvidas em transdução de sinal. Domínios PDZ mediam interações das proteínas da membrana plasmática ao citoesqueleto e organiza os complexos de sinalização celular (86). Proteínas RhoGAP, como ARHGAP21, aceleram a hidrólise de GTP para GDP, levando a inativação de Rho GTPases (Figura 9), enquanto proteínas RhoGEFs facilitam a troca de GDP para GTP, tornando assim as Rho GTPases ativas (84). Portanto, a ausência ou diminuição de ARHGAP21 acelera a ativação de Rho GTPases específicas e transmite sinais para os receptores de superfície reorganizar o citoesqueleto celular. Neste contexto, os domínios PDZ, PH e RhoGAP podem atuar como complexos de sinalizações intracelulares.



**Figura 9. ARHGAP21 é uma proteína RhoGAP.** RhoGAPs aceleram hidrólise de GTP, levando a inativação de Rho GTPases. A ausência de RhoGAPs resulta em maior ativação de Rho GTPases, que, quando ativas, interagem com proteínas efetoras que regulam o rearranjo do citoesqueleto através da organização de microtúbulos e filamentos de actina.

A proteína ARHGAP21 regula negativamente as Rho GTPases RHOA, RHOC (87) e CDC42 (88), e parece atuar como mediadora da dinâmica do citoesqueleto em vários tipos de células, participando da migração celular (87,89), polaridade celular (90), adesão celular (88,91,92), formação de fibras de estresse (93), morfologia (88) e regulação e posicionamento do Golgi (94,95).

Alguns estudos demonstraram a participação da ARHGAP21 na regulação do citoesqueleto em modelos tumorais. Em linhagens celulares de glioblastoma humano, o silenciamento gênico de ARHGAP21 alterou a morfologia celular, aumentou a ativação de sinalização dos efetores pela fosforilação da proteína FAK, a atividade de CDC42 e migração celular (88). Em células de adenocarcinoma de próstata, a inibição de ARHGAP21 aumentou a atividade de RHOA e RHOC, alterou a morfologia celular, reduziu o crescimento e aumentou a migração das células (87).

Além disso, trabalhos mostraram que Arhgap21 interage com a proteína Prickle1 e medeia uma nova via de sinalização lateral que coordena atividades protrusivas do córtex lateral de células cancerosas em migração. O silenciamento de Prickle1 resulta em aumento da atividade de RHOA, alterando a morfologia, migração e dinâmica de adesão focal (96).

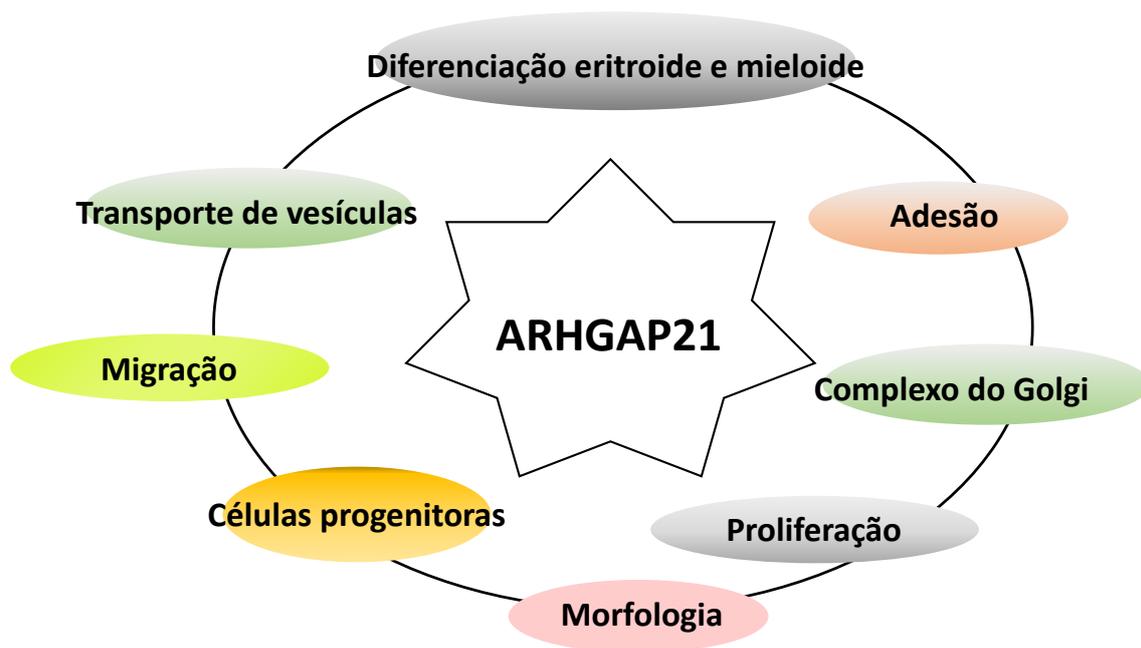
Em células epiteliais, ARHGAP21 interage com CDC42 durante a transição epitelial mesenquimal e seu silenciamento reduz este processo de forma concomitante a alteração de moléculas de adesão. Também foi observado que a ARHGAP21 interage com a tubulina  $\alpha$  e é essencial para a acetilação da tubulina na transição epitelial mesenquimal (91). Em células de rim humano embrionário, ARHGAP21 se liga diretamente a arrestina  $\beta 1$  e, em resposta à estimulação do receptor da angiotensina II tipo 1A, aumenta a atividade de RHOA e formação de fibras de estresse (93).

Em outros estudos foi evidenciada a participação de ARHGAP21 no transporte de vesículas e na regulação do complexo do Golgi. ARHGAP21 é recrutada para as membranas do Golgi por meio da ligação a GTP-ARF1, regulando o complexo Arp2 / 3 e a dinâmica da actina F através de CDC42 (95). O transporte da toxina Shiga em *Escherichia coli* ocorre através da sinalização de ARHGAP21 e CDC42 no complexo do Golgi, sendo a via secretora dependente do citoesqueleto (97).

A proteína ARHGAP21 também é expressa e participa do processo secretor de células beta pancreáticas, controla a expressão de genes que codificam proteínas da

maquinaria secretora e modula o rearranjo do citoesqueleto pela atividade da ERK1 / 2 (98). Em outro trabalho foi observado que o silenciamento da ARHGAP21 prejudica o metabolismo lipídico hepático, sendo o fígado de camundongos heterozigotos para o gene *Arhgap21* (*Arhgap21<sup>+/-</sup>*) mais sensível à insulina, o que foi associado com maior síntese e menor exportação de lipídios (99).

Nosso grupo de pesquisa demonstrou a participação da *Arhgap21* na hematopoiese. Camundongos homozigotos nocautes para o gene *Arhgap21* não são viáveis, e camundongos heterozigotos nocautes para *Arhgap21* (*Arhgap21<sup>+/-</sup>*) foram desenvolvidos em nosso laboratório. Estes animais apresentam cerca 50% de redução na expressão gênica e proteica de *Arhgap21*. Juliana Xavier-Ferruccio et al. reportaram aumento na frequência CTHs e capacidade prejudicada de células hematopoiéticas progenitoras em formar colônias *in vitro* em camundongos *Arhgap21<sup>+/-</sup>*. No sangue periférico, estes animais apresentaram discreta redução no número de glóbulos vermelhos e nos níveis de hemoglobina e aumento do número de glóbulos brancos e neutrófilos comparado aos camundongos do tipo selvagem. Os camundongos *Arhgap21<sup>+/-</sup>* também apresentaram discreta redução no número de plaquetas e aumento no volume plaquetário (92). Além disso, houve menor capacidade de células hematopoiéticas progenitoras aderirem à fibronectina e redução da expressão da integrina VLA4, os quais regulam a interação destas células com o microambiente da medula óssea. Ainda, observou-se o aumento da atividade de RHOC nas células da medula óssea de camundongos *Arhgap21<sup>+/-</sup>* em comparação aos camundongos do tipo selvagem. Por fim, o silenciamento de ARHGAP21 em progenitores mielóides comuns humanos e em progenitores bipotentes megacariócitos-eritrócitos favoreceu a diferenciação para à linhagem de megacariócitos, em detrimento da diferenciação eritroide (92).



**Figura 10. Proteína ARHGAP21 participa de múltiplos processos celulares.** De modo geral, ARHGAP21 está envolvida na diferenciação mieloide e eritroide, transporte de vesículas, adesão celular, migração, formação do complexo de Golgi, células progenitoras, proliferação e morfologia.

Apesar destes achados sobre ARHGAP21 na hematopoese e do papel do citoesqueleto na formação das plaquetas, as funções da ARHGAP21 na formação e atividade plaquetária nunca foram investigados. Descrevemos aqui, pela primeira vez, um papel importante desta proteína na biogênese plaquetária e na formação de trombo.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivos gerais**

Utilizando modelos *in vitro* (linhagem celular eritroleucêmica HEL) e *in vivo* (camundongos selvagens e heterozigotos nocautes para *Arhgap21*), avaliar o papel da proteína ARHGAP21 na diferenciação megacariocítica, resposta hemostática e biogênese plaquetária.

### **2.2. Objetivos específicos**

1. Avaliar a localização da ARHGAP21 no processo de diferenciação megacariocítica;
2. Avaliar a associação da ARHGAP21 com proteínas do citoesqueleto e de adesão de megacariócitos e plaquetas;
3. Avaliar o efeito da inibição da ARHGAP21 nas atividades das Rho GTPases CDC42 e RHOA ao longo do processo de diferenciação megacariocítica e proteínas efetoras;
4. Avaliar o processo hemostático de animais heterozigotos nocautes para ARHGAP21.

### **3. METODOLOGIA**

#### **3.1. Diferenciação megacariocítica da linhagem celular HEL**

Para estudo do modelo experimental, a linhagem humana HEL (leucemia mieloide eritroblástica) tem a capacidade de sofrer diferenciação megacariocítica e se diferenciar até a formação de megacariócito maduro, mas sem a formação de plaquetas (45). Por isso, estudos experimentais em processo de diferenciação megacariocítica são utilizados nesta linhagem celular.

A linhagem celular HEL foi obtida da American Type Culture Collection (ATCC). As células foram cultivadas em meio Roswell Park Memorial Institute (RPMI) contendo 10% de soro fetal bovino (SFB) e mantidas a 37 °C, 5% de CO<sub>2</sub>. A diferenciação megacariocítica foi induzida com 20 µM de phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EUA) por 4 dias. 1 X 10<sup>6</sup> células HEL foram marcadas para análise das populações hematopoiéticas. Todos os anticorpos foram incubados por 15 minutos à temperatura ambiente e foram diluídos em PBS. Alterações morfológicas e aquisição de marcadores de superfície foram avaliadas diariamente, respectivamente, por microscopia óptica e análise por citometria de fluxo. Os anticorpos integrina βIIIa (CD61-PE), integrina αIIb (CD41-FITC), integrina α2 (CD49b-APC) foram utilizados como marcadores da diferenciação megacariocítica e anticorpo glicoforina (CD235a-PE) como marcador de eritrócitos e precursores eritroides. A lista de todos os anticorpos utilizados em citometria para análise da população de células HEL estão descritos no item 3.12.

#### **3.2. Imunofluorescência e microscopia confocal**

A microscopia confocal foi utilizada para visualizar a localização da ARHGAP21 e os rearranjos citoesqueléticos durante a diferenciação megacariocítica das células HEL. As células foram cultivadas em lamínulas revestidas com colágeno, fixadas com paraformaldeído a 4% e permeabilizadas com Triton X-100 a 0,5% em PBS. Após o bloqueio com 5% de BSA por 60 minutos em temperatura ambiente, as células foram incubadas durante a noite a 4 °C com anticorpo anti-ARHGAP21 (1: 100) (Santa Cruz Technologies, Dallas, Texas, EUA) e anti-tubulina alfa 488 (1: 200) (Life Technologies, Carlsbad, Califórnia, EUA) em PBS contendo 3% de BSA. A incubação

com o anticorpo secundário Alexa Fluor 633 anti-rabbit (1: 400; Molecular Probes, Eugene, Oregon, EUA) e com Phalloidin 555 (1: 2500) (Life Technologies) foi então realizada em PBS contendo 1% de BSA por 2 h à temperatura ambiente. Todas as incubações foram seguidas por três lavagens com PBS por 5 minutos. As lâminas foram montadas em meio de montagem ProLong Gold com DAPI (Molecular Probes). As imagens foram geradas usando um microscópio confocal de varredura a laser (LSM780-NLO Carl Zeiss AG, Alemanha). O software Image J (U.S. National Institutes of Health) foi utilizado para analisar a colocalização de proteínas, área celular, circularidade e relação de proporção (eixo maior/eixo menor). Campos aleatórios contendo um total de > 100 células no dia 0, 30 células no dia 1, > 100 células no dia 2, > 300 células no dia 3 e > 400 células no dia 4 foram utilizados para determinar esses parâmetros.

### **3.3. Imunoprecipitação e western blotting**

A interação da ARHGAP21 e tubulina alfa foi avaliada por imunoprecipitação, enquanto a expressão e/ou atividade das proteínas citoesqueléticas foram avaliadas por western blotting em células HEL submetidas à diferenciação megacariocítica. As células foram lisadas em tampão Tris-HCl gelado (Tris 100 mM, pH 7,5) contendo 10 mM de EDTA, 1% Triton X-100, 100 mM de NaF e inibidores de fosfatase e protease (10 mM de  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ , 10 mM de  $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ , 25 mM de PMSF e 0,1 mg / mL de aprotinina). Quantidades iguais de lisados celulares foram submetidas à eletroforese em gel poliacrilamida SDS-PAGE (500  $\mu\text{g}$  para a imunoprecipitação e 10  $\mu\text{g}$  para Western blotting). Após a corrida no gel, as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose. As membranas foram bloqueadas com TBS-T (10 mmol/L Tris, 150 mmol/L NaCl, e 0,02% Tween-20) contendo leite em pó magro 5% por pelo menos 1h, antes de serem incubadas com os anticorpos primários específicos diluídos em TBS-T contendo leite em pó magro 3%. A membrana de nitrocelulose foi então incubada com anticorpos específicos por 12 horas a 4°C e então lavadas 3 vezes com solução TBS-T.

Para a imunoprecipitação, as membranas foram incubadas por 12 horas com anticorpo anti-ARHGAP21 ou imunoglobulina IgG goat (controle negativo). Os complexos foram precipitados com proteína-G-sepharose (GE) e analisados por western blotting utilizando anticorpo tubulina alfa como normalizador de expressão proteica das

amostras. Os anticorpos primários utilizados no western blotting para avaliação da expressão e/ou atividade das proteínas citoesqueléticas estão descritos na Tabela 1.

As análises quantitativas das intensidades ópticas das bandas de proteínas foram realizadas com Un-Scan-It Gel 6.1 (Silk Scientific Inc., Utah, EUA). A intensidade de expressão proteica foi normalizada pela expressão da actina ou GAPDH e a intensidade da fosforilação proteica foi normalizada pela expressão da proteína correspondente.

**Tabela 1. Lista dos anticorpos utilizados nos ensaios de imunoprecipitação e western blotting.**

<b>PROTEÍNA</b>	<b>FABRICANTE</b>	<b>CÓDIGO</b>	<b>CONCENTRAÇÃO</b>	<b>ESPÉCIES</b>
<b>Actina</b>	Santa Cruz Biotech	sc-16161	1:2000	camundongo, rato, humano, <i>Drosophila melanogaster</i> , <i>Xenopus laevis</i> , peixe-zebra e <i>Caenorhabditis elegans</i>
<b>Actinina Alfa</b>	Santa Cruz Biotech	sc-17829	1:1000	camundongo, rato e humano
<b>ARHGAP21</b>	Santa Cruz Biotech	sc-390145	1:000	camundongo, rato e humano
<b>ARP 2 (H-84)</b>	Santa Cruz Biotech	sc-15389	1:000	camundongo, rato e humano
<b>ARP 3 (C-16)</b>	Santa Cruz Biotech	sc-10132	1:000	camundongo, rato e humano
<b>Cadeia leve da miosina II (MLC)</b>	Santa Cruz Biotech	#3672	1:000	camundongo, rato e humano
<b>CDC42</b>	Cell Signaling	#2462	1:2000	humano, camundongo, rato, macaco, bovino
<b>Cofilina (D3F9)</b>	Cell Signaling	#5175	1:2000	humano, camundongo, rato, macaco, cachorro
<b>FAK (C-20)</b>	Santa Cruz Biotech	sc-558	1:000	camundongo, rato, humano, frango, <i>Xenopus laevis</i> e peixe-zebra
<b>Fosfo-cofilina (Ser3)</b>	Cell Signaling	#3313	1:2000	humano, camundongo, rato, macaco, bovino
<b>Fosfo-FAK Tyr 925</b>	Santa Cruz Biotech	sc-101680	1:000	Humano

<b>Fosfo-MLCII Ser19</b>	Cell Signaling	#3675	1:000	humano, camundongo, rato, bovino, porco
<b>Fosfo-Op18 Ser16</b>	Santa Cruz Biotech	sc-12948-R	1:000	camundongo, rato e humano
<b>Fosfo-p130 CAS (Tyr410)</b>	Cell Signaling	#4011	1:000	camundongo, rato e humano
<b>Fosfo-Paxilina (y118)</b>	Cell Signaling	#2541	1:000	humano, camundongo, rato, macaco, porco
<b>Fosfo-Zyxin</b>	Abcam	Ab78910	1:000	Humano
<b>Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)</b>	Santa Cruz Biotech	sc-32233	1:4000	camundongo, rato, humano, coelho e Xenopus laevis
<b>p130 CAS (C20)</b>	Santa Cruz Biotech	sc-860	1:000	camundongo, rato e humano
<b>Paxilina</b>	BD	610052	1:000	Canis lupus familiaris (cão doméstico), Gallus gallus domesticus (galinha), Homo sapiens (humano), Mus musculus (rato doméstico), Rattus norvegicus (rato)
<b>RHO associado a quinase (ROCK) I</b>	Santa Cruz Biotech	sc-5560	1:2000	camundongo, rato e humano
<b>RHO associado a quinase (ROCK) II</b>	Santa Cruz Biotech	sc-5561	1:2000	camundongo, rato e humano
<b>RHOA (67B9)</b>	Cell Signaling	#2117	1:2000	humano, camundongo, rato, macaco, bovino
<b>Estatmina (Op18) (E-3)</b>	Santa Cruz Biotech	sc-55531	1:000	camundongo, rato e humano
<b>Talina (C-20)</b>	Santa Cruz Biotech	sc-7534	1:000	camundongo, rato e humano
<b>Tubulina alfa acetilada</b>	Cell Signaling	#5335	1:000	camundongo, rato, humano, macaco, peixe-zebra
<b>Tubulina alfa destirosinada (tubulina glu)</b>	Abcam	ab48389	1:2000	Humano
<b>Tubulina alfa tirosinada</b>	Santa Cruz Biotech	sc-5286	1:000	camundongo, rato e humano

<b>(tubulina <math>\alpha</math>) (B-7)</b>				
<b>Vinculina (G-11)</b>	Santa Cruz Biotech	sc-55465	1:000	camundongo, rato e humano
<b>Zyxin</b>	Abcam	ab58210	1:000	mouse, human

### 3.4. Silenciamento da ARHGAP21 usando siRNA

O silenciamento transitório da ARHGAP21 foi realizado em células HEL com uma mistura de quatro sequências de oligonucleotídeos específicos para silenciamento da proteína ARHGAP21 – siARH21 (siRNA ARHGAP21Human - ARHGAP21 ON-TARGETplus SMARTpool, Dharmacon) na concentração de 50 nM ou silenciamento de uma proteína inespecífica - siCTRL (siRNA controle ON-TARGETplus Non-targeting Pool) (Tabela 2) na concentração de 50 nM. As células foram cultivadas em placas de 6 poços, transfectadas com siRNAs, e Lipofectamine 2000 (ThermoFisher Scientific) e foi submetida a centrifugação 1800 rpm por 2 horas e incubado por 16 horas a 37°C para permitir a entrada do oligonucleotídeo na célula. A diferenciação megacariocítica foi induzida após o final da transfecção com a troca do meio RPMI contendo 20  $\mu$ M de PMA e o silenciamento da ARHGAP21 foi confirmado por western blotting.

**Tabela 2. Sequência de siRNA específicos para silenciamento de ARHGAP21.**

<b>siARH (combinação das sequências 1, 2, 3 e 4)</b>	<b>Sequencia (5'-3')</b>
<b>Sequência 1</b>	F: GAAAAUAGCAGAUCGGUUAUU R: PUAACCGAUCUGCUAUUUUCUU
<b>Sequência 2</b>	F: GAUGAUAAAUGGCGAGAUUUU R: PAAUCUCGCCAUUUAUCAUCUU
<b>Sequência 3</b>	F: GGAUCUAAUUAGUCGAAGAUU R: PUCUUCGACUAAUUAGAUCUU
<b>Sequência 4</b>	F: GCACAGAGAUGCUACCGAAUU R: PUUCGGUAGCAUCUCUGUGCUU

### 3.5. Ensaios de polimerização de tubulina e actina

A expressão da ARHGAP21 foi investigada em extratos proteicos de células HEL contendo tubulina ou actina solubilizadas ou polimerizadas, conforme descrito por Ng DC et al. (100) e Zhang C et al. (101). Para o ensaio de polimerização da tubulina, quantidades iguais de células HEL ( $1 \times 10^6$ ) foram lisadas após 0, 1, 2, 3 e 4 dias de diferenciação megacariocítica, usando tampão estabilizador de microtúbulos (0.1M Pipes, pH 6.9, 2M glicerol, 5mM MgCl<sub>2</sub>, 2mM EGTA, 0.5% Triton X-100, inibidores

de protease e 4  $\mu$ M taxol). Após a lise, a tubulina solubilizada no sobrenadante foi separada da tubulina polimerizada por centrifugação (40.000 g por 30 min a 22 ° C) para separar a fração insolúvel (sob a forma de precipitado) das proteínas solúveis no sobrenadante. Em seguida, as frações insolúveis precipitadas foram solubilizadas em tampão estabilizador de microtúbulos e dissociadas através de sonicação, para assegurar a ruptura completa dos microtúbulos. A expressão das proteínas foi então analisada por western blotting em ambas as frações proteicas, como descrito anteriormente.

Para o ensaio de polimerização de actina, as células foram lisadas com tampão de estabilização de actina F (50 mM PIPES pH 6.9, 50 mM NaCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM EGTA, 5% glycerol, 0.1% NP-40, 0.1% Triton X-100, 0.1% Tween-20, 0.1%  $\beta$ -mercaptoethanol, 1 mM ATP, inibidores de protease) por 30 min a 37 ° C e depois centrifugadas (2.000 rpm por 5 min). A actina polimerizada precipitada foi suspensa em metade do volume inicial do mesmo tampão por ultracentrifugação (40.000 g por 30 min a 22 ° C). Todas as amostras foram desnaturadas em tampão Laemmli e também submetidas a western blotting.

### **3.6. Análise de DNA de megacariócitos**

A ploidia das células HEL foi analisada durante a diferenciação megacariocítica por incubação de células fixadas (100% etanol a 4°C por 12 horas) com solução de coloração (PBS contendo 0,5% de BSA, 0,05 mg / mL PI e 1 mg / mL RNase) a 37°C por 30 minutos. O conteúdo de DNA foi determinado por citometria de fluxo (FACSCalibur, BD Biosciences) e analisado com o software FlowJo.

### **3.7. Ensaio de ativação RHOA e CDC42**

As atividades CDC42 e RHOA foram determinadas em células HEL e células primárias usando kit de ativação G-Lisa (Cytoskeleton, Inc, Denver, CO, USA). Os kits detectam as ligações de CDC42-GTP e RHOA-GTP por um anticorpo específico, sendo o grau de ativação determinado por comparação colorimétrica das leituras de amostras. Extratos proteicos (50  $\mu$ l) na concentração proteica de 0,25-1 mg / ml foram incubados com anticorpo monoclonal anti-CDC42 e extratos proteicos (25  $\mu$ l) na concentração proteica de 0,4-2 mg / ml foram incubados com o anticorpo monoclonal anti-RHOA. Após 15 min de incubação com o anticorpo anti-CDC42 e 30 min de incubação com o

anticorpo anti-RHOA, os poços foram lavados com tampão de lavagem para a remoção das ligações não ativas (CDC42-GDP e RHOA-GDP). Em seguida, utilizou-se o anticorpo secundário marcado com HRP para a detecção das atividades. Em espectrofotômetro de microplaca, a leitura da absorbância foi mensurada em 490nm.

### 3.8. Camundongos *Arhgap21*<sup>+/-</sup>

Camundongos nocautes C57BL/6 heterozigotos para *Arhgap21* (*Arhgap21*<sup>+/-</sup>) foram gerados e genotipados conforme descrito por Xavier-Ferrucio et al. (92). Os camundongos *Arhgap21*<sup>+/-</sup> apresentaram redução de 50% de RNAm e proteína nas células da medula óssea em comparação com o tipo selvagem. A exclusão de ambos os alelos resultou em letalidade embrionária (92). Os animais foram criados e alojados em biotério próprio da Universidade Estadual de Campinas e mantidos em ciclos claro/escuro de 12h com livre acesso a ração e água. Procedimentos experimentais foram realizados com camundongos machos e fêmeas (8 a 11 semanas de idade). O Comitê de Ética da Universidade Estadual de Campinas (CEUA) aprovou todos os cuidados e procedimentos com animais, que seguiram as orientações para cuidados e uso de animais em laboratório (protocolo 3090-1 (B) / 2018).

### 3.9. Análise da população megacariocítica *Arhgap21*<sup>+/-</sup>

As células hematopoiéticas da medula óssea foram isoladas de camundongos *Arhgap21*<sup>+/-</sup> e camundongos do tipo selvagem. Células da medula óssea foram obtidas através da maceração de fêmures, tíbias e úmeros de animais selvagens e *Arhgap21*<sup>+/-</sup>. As hemácias foram lisadas (155mM NH<sub>4</sub>CL, 10 mM NaHCO<sub>3</sub>, 0,1mM EDTA). Em seguida, lavou-se 3 vezes com PBS e as células foram ressuspensas novamente em PBS. 1 X 10<sup>6</sup> células de medula óssea foram marcadas para análise das populações hematopoiéticas. Todos os anticorpos foram incubados por 15 minutos à temperatura ambiente e foram diluídos a 1:200 em PBS. Após duas lavagens as células foram ressuspensas em 300µL de PBS e lidas em citômetro de fluxo (FACSCalibur, BD Biosciences). As análises das populações hematopoiéticas foram realizadas através dos programas FlowJo. As populações megacariocíticas foram quantificadas por citometria de fluxo (FACSCalibur, BD Biosciences) usando anticorpos para a integrina βIIIa (CD61-PE), integrina αIIb (CD41-FITC) e complexo GPIb-V-IX (CD42d-APC). O

software FlowJo foi utilizado para análise dos resultados obtidos (TreeStar Inc., v10). A lista contendo todos os anticorpos utilizados em citometria para análise das populações celulares murinas pode ser encontrada no item 3.12.

Os megacariócitos também foram visualizados em biópsias da medula óssea de camundongos *Arhgap21<sup>+/-</sup>* e do tipo selvagem. Resumidamente, os fêmures foram fixados em formalina a 10%, embebidos em parafina, seccionados, colocados em lâminas e corados com hematoxilina e eosina. O número de megacariócitos foi determinado em pelo menos 10 campos aleatórios das lâminas capturados através de um microscópio óptico (objetiva de 40 ×).

### **3.10. Diferenciação megacariocítica *in vitro* de células primárias murinas**

Células totais da medula óssea de camundongos *Arhgap21<sup>+/-</sup>* e do tipo selvagem foram cultivadas em placas de 6 poços com meio Stem Spam (StemCell Technologies, Vancouver British Columbia, CA) suplementado com 10% Bit (StemCell Technologies), 50 ng / mL de trombopoietina (TPO) (PreproTech, Ribeirão Preto, São Paulo, BR), 10 ng / mL de IL-3 e 10 ng / mL de IL-6 (BD Biosciences). As células foram coletadas para análise da expressão gênica e de proteínas nos dias 0, 2 e 5 de diferenciação. A morfologia celular foi visualizada por microscopia óptica após cinco dias de cultura.

### **3.11. PCR quantitativo**

A expressão do gene *ARHGAP21* foi avaliada por PCR quantitativo em tempo real durante a diferenciação megacariocítica de células de camundongo. Resumidamente, o RNA total foi isolado com o kit Illustra RNASpin Mini RNA (GE Healthcare Life Sciences) e transcrito reversamente em DNAc com o Kit RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Fisher). As reações foram realizadas em StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems) com Power SYBR Green master mix (Thermo Fisher). Foram utilizados os seguintes primers: *Arhgap21* (*Fw* GAGGAAAGCTTCAAGCACCA, *R* GATGACAGCAGATCAGGAA) na concentração de 150 nM e *Gapdh* (*Fw* TGACCACCAACAACACTGCTTA, *R* GGATGCAGGGATGATGTTC) na concentração de 150 nM. A expressão relativa do gene foi calculada usando a equação  $2^{-\Delta\Delta CT}$  (102). A padronização e curva de

eficiências dos primers acima foram anteriormente estabelecidas pelo grupo de pesquisadores do nosso laboratório.

### 3.12. Ensaio de colônias de megacariócitos UFC-Mk murinos

UFC-Mk foram avaliadas em células da MO de camundongos Arhgap21<sup>+/-</sup> ou de camundongos do tipo selvagem usando meio metilcelulose (M3434, Stem Cell Technologies), suplementado com fatores de crescimento 10 ng / mL IL-3, 10 ng / mL IL-6, 10 ng / mL IL-11 e 50 µg / mL de trombopoietina (TPO) (PeproTech). Após 12 dias a 37 ° C, 5% de CO<sub>2</sub> e alta umidade, as unidades formadoras de colônias foram coletadas e caracterizadas por citometria de fluxo, utilizando os seguintes anticorpos: CD61- PE, CD41- FITC e CD42d - APC. A análise de fluorescência foi realizada com FACSCalibur (Becton – Dickinson) e os resultados obtidos foram analisados com o software FlowJo (TreeStar Inc.). O meio à base de colágeno MegaCult-C (StemCell Technologies) também foi utilizado para a análise de UFC-Mk, e foram contadas após 10 dias em cultura. Todos os anticorpos utilizados estão descritos na tabela 3.

**Tabela 3. Lista dos anticorpos utilizados nos ensaios de citometria.**

ANTICORPO	FABRICANTE	CÓDIGO	CONCENTRAÇÃO	ESPÉCIES
CD61-PE	Biologend	336406	1:200	Humano
CD41-FITC	Life Technologies	MHCD4101	1:200	Humano
CD49b-APC	Biologend	359310	1:200	Humano
CD235a-PE	BD Biosciences	555570	1:100	Humano
CD61-PE	eBioscience	12-0611-82	1:200	Mouse
CD41-FITC	BD Biosciences	553848	1:200	Mouse
CD42d-APC	Biologend	148506	1:200	Mouse
CD62P-APC	Biologend	148304	1:400	Mouse

### 3.13. Preparação de plaquetas

Camundongos Arhgap21<sup>+/-</sup> e camundongos do tipo selvagem foram anestesiados com isoflurano, e o sangue foi coletado por punção cardíaca em 1: 9 (v / v) de ACD-C

(12,4 mM de citrato de sódio, 13 mM de ácido cítrico, 11 mM de glicose). Primeiro, o plasma rico em plaquetas (PRP) foi obtido por centrifugação do sangue total a 2.000g por 30 segundos em temperatura ambiente. Sete partes de PRP foram adicionadas a cinco partes de tampão de lavagem (NaCl 140 mM, KCl 0,5 mM, citrato trissódico 12 mM, glicose 10 mM, sacarose 12,5 mM, pH 6). As plaquetas lavadas foram obtidas após duas centrifugações em tampão a 800 g por 8 min (103).

### **3.14. Ensaio de agregação plaquetária**

As plaquetas lavadas foram suavemente suspensas em solução de Krebs contendo NaCl 118 mM, NaHCO<sub>3</sub> 25 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,2 mM, MgSO<sub>4</sub> 1,7 mM e glicose 5,6 mM (pH 7,4) na presença de CaCl<sub>2</sub> 1 mM. A agregação plaquetária (200 µL com 3 x 10<sup>8</sup> plaquetas / mL) foi medida usando um agregômetro óptico (Profiler, 8 canais PAP-8 V2.0 ópticos. Bio-Data Corporation, Horsham, PA, EUA) a 37 ° C em cubetas de vidro contendo uma barra para agitação constante, conforme descrito por Lescano CH et al. (104). A agregação foi induzida com 0,015 U / mL ou 0,1 U / mL de Trombina (Sigma Aldrich) e medida por até 8 minutos.

### **3.15. Determinação da exposição de superfície da p-selectina**

As plaquetas lavadas foram suspensas em tampão Tyrode-Hepes modificado (NaCl 134 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,34 mM, KCl 2,9 mM, NaHCO<sub>3</sub> 12 mM, HEPES 5 mM, MgCl<sub>2</sub> 1 mM, glicose 5 mM, BSA 0,35%, pH 7,4) na presença de prostaglandina (0,1 µg / mL) e apirase (0,02 U / mL). As amostras foram ativadas com trombina 0,1 U / mL e 0,2 U / mL (Sigma Aldrich) e marcadas com anti-CD62P-APC por 15 min a 37 ° C. A análise foi realizada usando FACSCalibur (BD Biosciences) e software FlowJo (TreeStar Inc.).

### **3.16. Microscopia eletrônica de transmissão**

As plaquetas lavadas foram centrifugadas (2500 rpm por 20min 25 ° C) e o sedimento (que contém as plaquetas) foi fixado com glutaraldeído 2,5% em tampão cacodilato 0,1 M (pH 7,2) sacarose 2% por 2 h. As amostras foram lavadas em tampão cacodilato por três vezes, pós-fixados em tetróxido de ósmio 1% por 1 h à 4° C

e desidratados pelo álcool etílico em concentrações crescentes. Na próxima etapa, as amostras foram pré-embebidas em mistura de óxido de propileno e resina epon, na proporção de 1:1, 3:1 por 2 horas e embebidas em resina epon durante a noite. Ainda, foram incluídas em resina e mantidas em estufa a 57° durante 72 h. Os materiais foram cortados em ultramicrotomo com navalhas de vidro e cortes finos foram corados com acetato de uranila e examinados em microscópio eletrônico de transmissão (LEO 906-Carl Zeiss). As diferenças no tamanho granular foram quantificadas usando ImageJ (imagej.nih.gov) em campos de tamanho equivalente selecionados aleatoriamente de um pool de plaquetas de três camundongos do tipo selvagem e de três camundongos Arhgap21<sup>+/-</sup>. Apenas as plaquetas totalmente representadas nesses campos foram consideradas. Todos os grânulos  $\alpha$  nessas plaquetas foram identificados manualmente com base em suas características morfológicas previamente descritas nas seções MET (105–107) sem conhecimento do genótipo do camundongo (número total de grânulos analisados = 79).

### **3.17. Ensaio de sangramento da veia na cauda**

Em camundongos anestesiados, a veia na cauda foi perfurada com uma agulha 21G (BD Precision Glide 0,80 x 0,25mm) e imersa em PBS a 37 ° C. O tempo de sangramento da veia na cauda foi registrado desde a incisão até a cessação do sangramento.

### **3.18 Avaliação da oclusão da artéria carótida e formação de trombo**

A lesão da artéria carótida foi induzida com FeCl<sub>3</sub> por 3 min em camundongos Arhgap21<sup>+/-</sup> (n = 10) ou camundongos do tipo selvagem (n = 8) anestesiados e pesando 25 ± 2 g, conforme descrito por Carneiro GD et al. (108). O tempo de oclusão do vaso foi determinado usando uma sonda de ultrassom (Transonic Flowprobe MAO 5 PSB, Ithaca, NY) posicionada na artéria carótida lesada. O tempo de oclusão foi considerado o intervalo entre a lesão inicial e a cessação total do fluxo sanguíneo registrado no programa DATAQ (Transonic System TS 420, Ithaca, NY, EUA). Três animais de cada grupo foram utilizados para análise de formação de trombo por microscopia intravital (Carl Zeiss - Imager A2) conforme descrito anteriormente (108). Rodamina 6G (Sigma Aldrich), que marca plaquetas e leucócitos, foi injetada na veia da cauda para permitir a

visualização da incorporação de células e formação de trombos *in vivo*. Imagens da dinâmica da formação do trombo foram capturadas por 13 minutos com 1 frame/sec (AxioCAN - lente HSM 5X) e a análise foi realizada com o software ImageJ 1.42q.

### **3.19. Análise estatística**

A análise estatística foi realizada usando o software GraphPad Prism9 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, EUA). Os resultados são mostrados como média  $\pm$  desvio padrão (DP) de pelo menos três experimentos independentes por grupo. As comparações foram realizadas com o teste *t Student Two tailed* e teste *One-way Anova com análise Tukey's Multiple Comparison* e valores de  $P < 0,05$  foram considerados estatisticamente significativos.

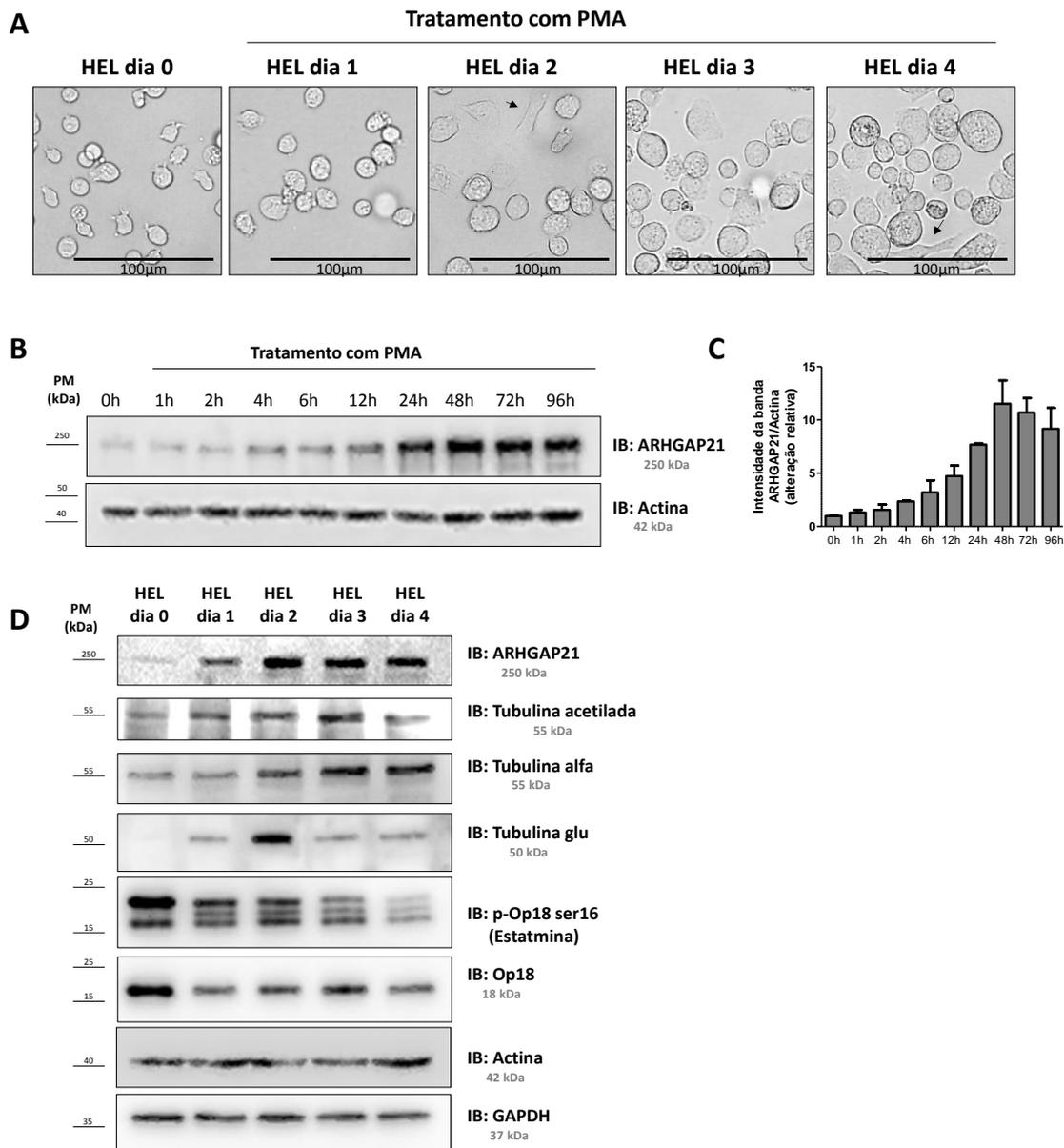
## 4. RESULTADOS

### **PARTE 1. Estudo do papel da ARHGAP21 durante a diferenciação megacariocítica *in vitro***

#### **4.1. A expressão da ARHGAP21 aumenta durante a diferenciação megacariocítica das células HEL, concomitante às alterações do citoesqueleto**

Primeiramente, detectamos a expressão da ARHGAP21 em células HEL estimuladas com PMA por 4 dias. O dia 0 representa as células sem tratamento, e dias 1, 2, 3 e 4 representam as células que foram estimuladas a se diferenciarem em cultura nos respectivos dias.

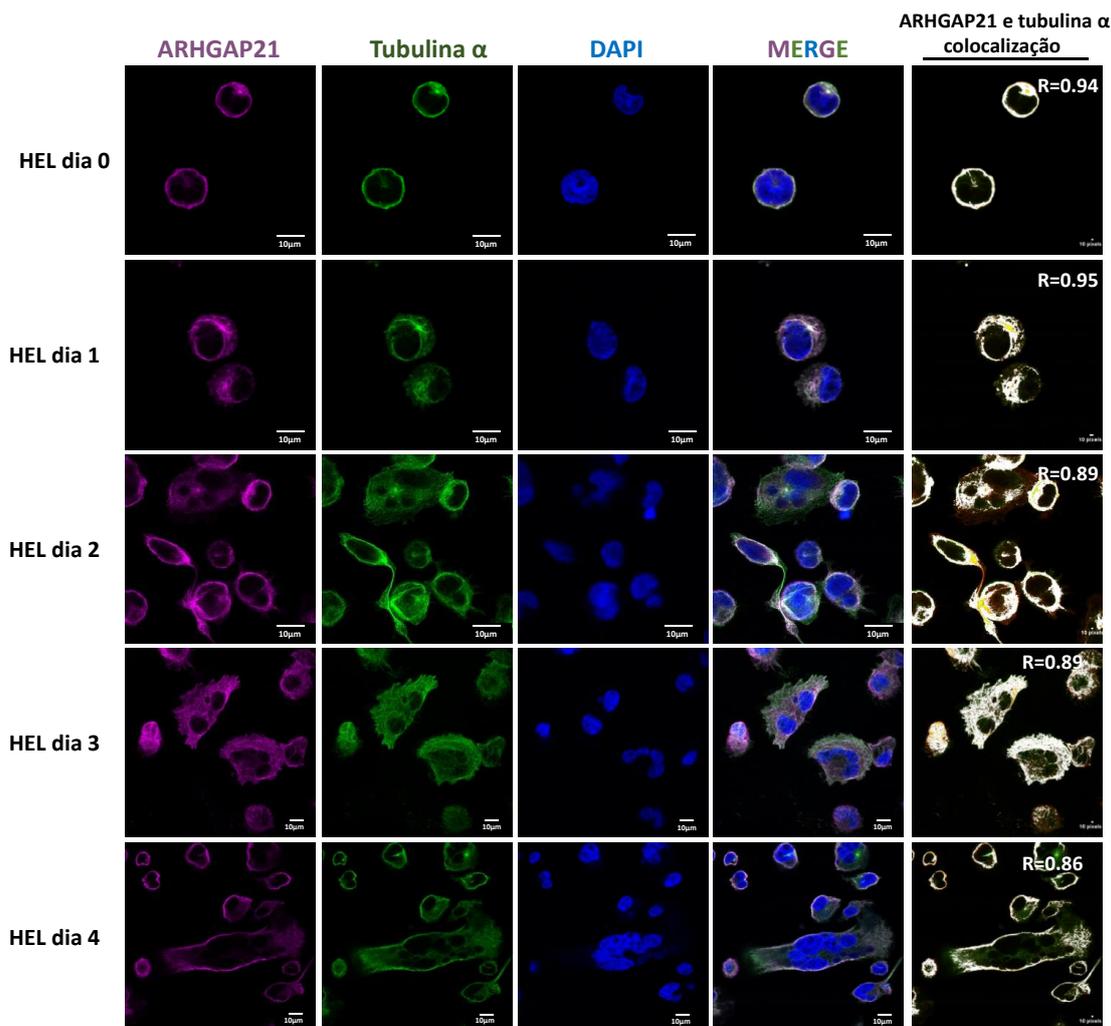
Como esperado, as células HEL apresentaram alterações morfológicas ao longo da diferenciação megacariocítica, como aumento do tamanho e formação de extensões citoplasmáticas (Figura 11A). A expressão proteica de ARHGAP21 aumentou acentuadamente durante a diferenciação, principalmente nos dias 2 e 3 (com a expressão mais alta no dia 2) (Figura 11B-C). Observamos também o aumento da expressão proteica da tubulina acetilada, tubulina glu, tubulina alfa e diminuição da estatmina (p-Op18 ser16). Curiosamente, assim como ARHGAP21, a tubulina glu também mostrou expressão mais elevada no segundo dia de diferenciação (Figura 11D).



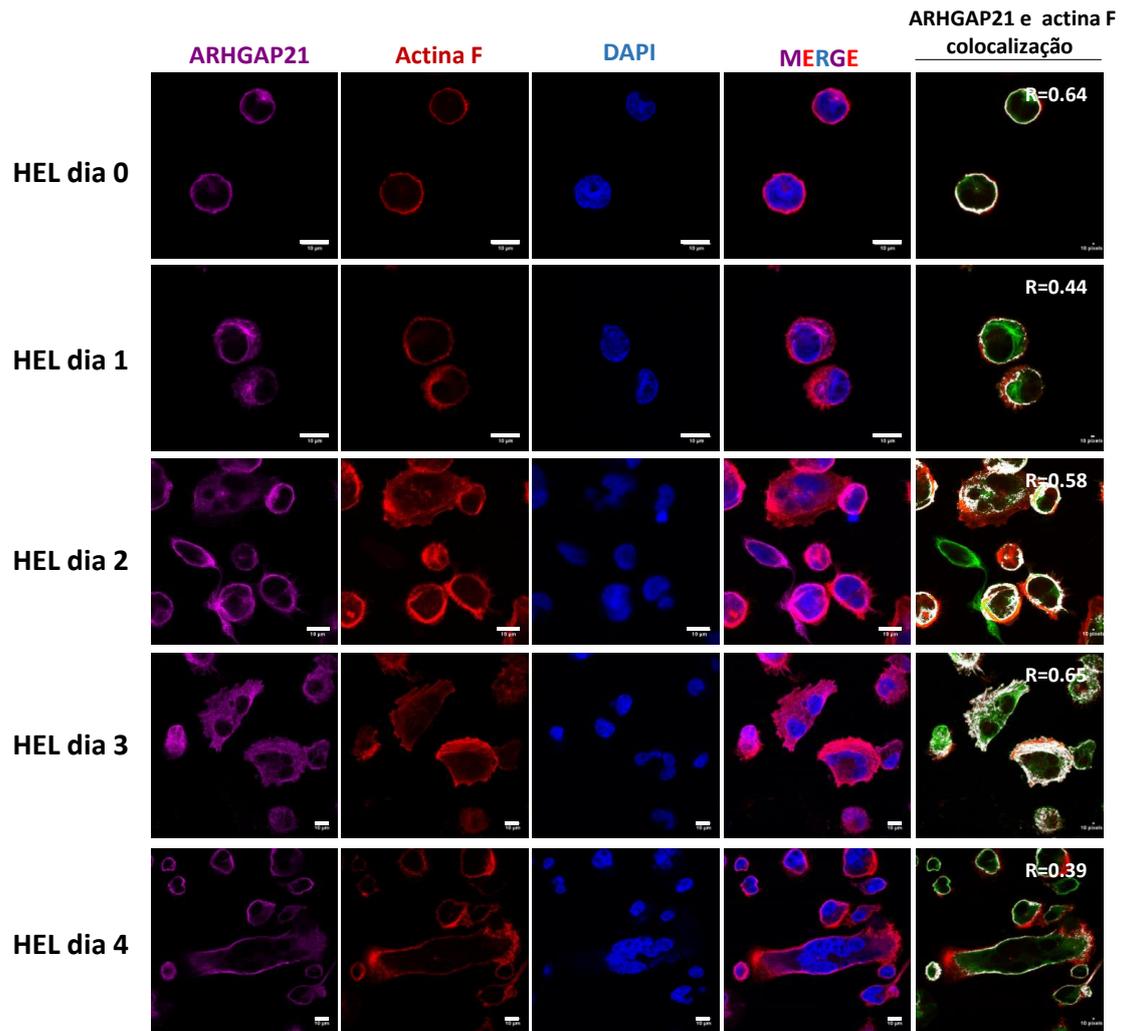
**Figura 11. A expressão da ARHGAP21 é aumentada durante a diferenciação megacariocítica das células HEL.** As células HEL foram tratadas com 20 $\mu$ M de PMA para induzir diferenciação megacariocítica. (A) Morfologia das células HEL durante a diferenciação (setas pretas indicam protrusões celulares). Barra de escala, 100  $\mu$ m. (B) A expressão da ARHGAP21 foi avaliada durante a diferenciação megacariocítica por Western blotting. A actina foi usada como amostra normalizadora. (C) As barras representam a análise da alteração relativa de densitometria de pixels como média  $\pm$  DP de dois experimentos independentes. A taxa de proporção da ARHGAP21 / actina foi normalizada por células HEL não induzidas (0h). As análises quantitativas das bandas de proteínas foram realizadas com Un-Scan-It Gel 6.1 (Silk Scientific Inc.). (D) Expressão da tubulina acetilada, tubulina glu, tubulina alfa e p-Op18 ser16 durante a diferenciação. Os anticorpos foram usados conforme indicado; actina e GAPDH foram usados como amostras normalizadoras.

#### 4.2. ARHGAP21 colocaliza e interage com tubulina alfa e altera a expressão da tubulina glu durante a diferenciação megacariocítica de células HEL

A análise por confocal mostrou que ARHGAP21 colocaliza fortemente com tubulina alfa no citoplasma e nas protrusões celulares (coeficiente de correlação  $R \geq 0,86$  em todos os dias de diferenciação) (Figura 12), enquanto a colocalização com a actina foi observada fracamente ( $R \leq 0,65$ ) (Figura 13).

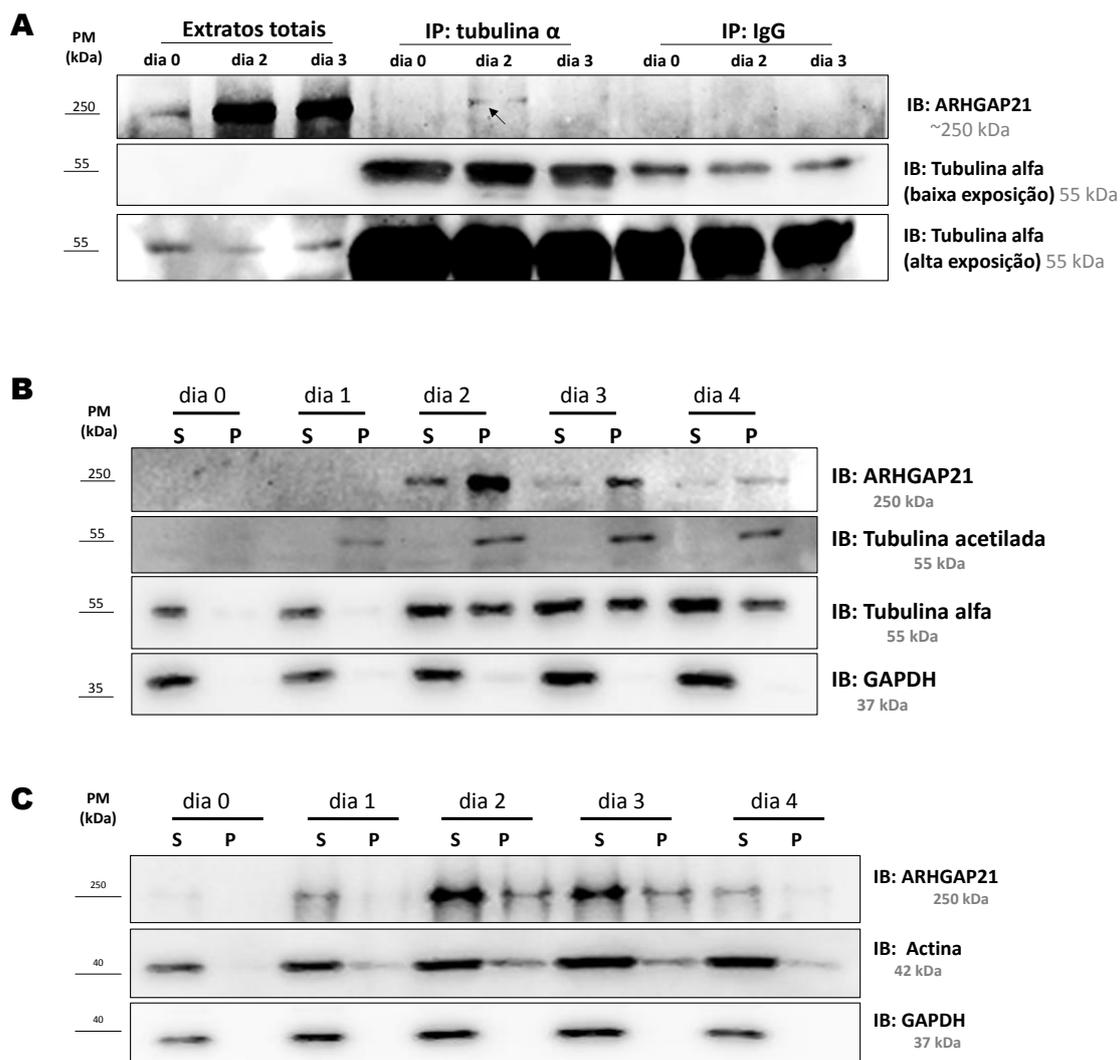


**Figura 12.** ARHGAP21 e tubulina  $\alpha$  se colocalizam durante a diferenciação megacariocítica. (A) Imagens de confocal de ARHGAP21 (em roxo), tubulina  $\alpha$  (em verde) e núcleo (DAPI em azul). Merge representa a sobreposição de todas as imagens. A colocalização da ARHGAP21 e da tubulina  $\alpha$  foi analisada usando o *software* Image J e representada por pontos brancos. O coeficiente de correlação (R) entre as duas proteínas é indicado na figura. Barra de escala 10 $\mu$ m.



**Figura 13. ARHGAP21 e actina F apresentam pouca colocalização durante a diferenciação megacariocítica.** (A) Imagens de confocal de ARHGAP21 (em roxo), actina F (em vermelho) e núcleo (DAPI em azul). Merge representa a sobreposição de todas as imagens. A colocalização de ARHGAP21 e actina F foi analisada usando o *software* Image J e representada por pontos brancos. O coeficiente de correlação (R) entre as duas proteínas é indicado na figura. Barra de escala 10 $\mu$ m.

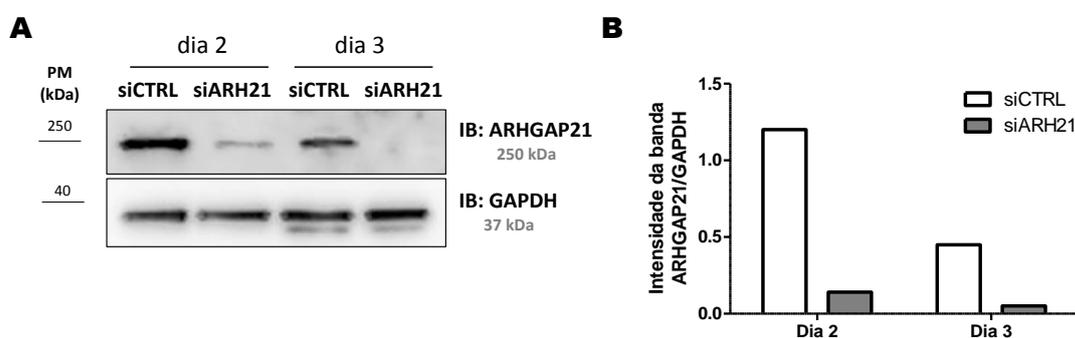
A interação entre ARHGAP21 e tubulina  $\alpha$  foi detectada por imunoprecipitação no dia 2 de diferenciação megacariocítica, quando o aumento da expressão de ARHGAP21 foi maior (Figura 14A). Em seguida, investigamos a expressão da ARHGAP21 em extratos de proteínas de células HEL contendo tubulina solúvel ou polimerizada e confirmamos o aumento da expressão de tubulina acetilada durante a diferenciação. Maior expressão de ARHGAP21 foi detectada nos extratos contendo tubulina polimerizada, em comparação com os extratos contendo tubulina solúvel (Figura 14B), e a expressão de ARHGAP21 foi semelhante nas frações de proteína contendo actina polimerizada e actina solúvel (Figura 14C).



**Figura 14. ARHGAP21 associa-se com tubulina  $\alpha$  e está super expressa em extratos contendo tubulina polimerizada.** (A) Imunoprecipitação (IP) e *Immunoblotting* (IB) usando extrato proteico de células HEL não tratada (dia 0) e tratada com PMA (dias 2 e 3). O anticorpo isotipo IgG foi usado como controle. A seta preta indica a presença da banda ARHGAP21 em extratos celulares a partir do dia 2 de diferenciação imunoprecipitada com anticorpo da tubulina alfa. (B) Expressão da ARHGAP21, tubulina acetilada e tubulina alfa em extratos contendo microtúbulos solúveis (S) e polimerizados (P) de células HEL submetidas a diferenciação megacariocítica. GAPDH foi utilizado como controle do isolamento eficiente de P e S. (C) Expressão de ARHGAP21 e actina em extratos proteicos contendo actina solúvel (S) e actina polimerizada (P) de células HEL submetidas a diferenciação megacariocítica. GAPDH foi utilizado como controle do isolamento eficiente de P e S.

### 4.3. A inibição de ARHGAP21 foi efetiva em células induzidas à diferenciação megacariocítica

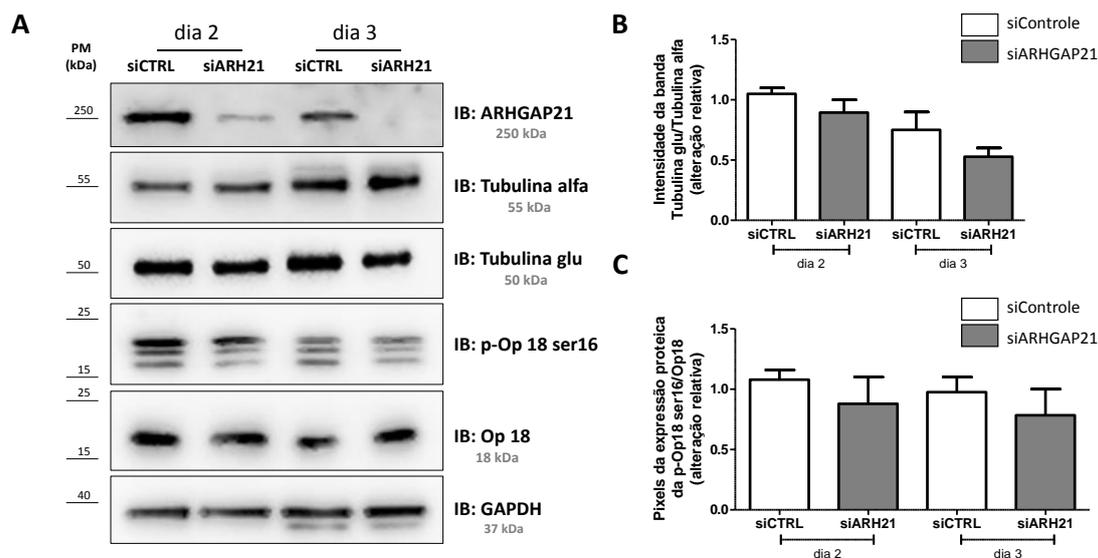
Células HEL foram transfectadas com siRNAs específicos para silenciamento da proteína ARHGAP21 (siARH) ou para silenciamento de uma proteína inespecífica (siCTRL). Análise por western blotting mostrou que o silenciamento foi de 92% para células siARH21 (dia 2 da diferenciação megacariocítica) e de 99% para células siARH21 (dia 3 da diferenciação megacariocítica), quando comparadas às células siCTRL (Figura 15A-B).



**Figura 15. Silenciamento da ARHGAP21 mediada por oligonucleotídeos (siRNA) em células HEL.** (A) Expressão da ARHGAP21 em extratos proteicos de células siCTRL e siARH21 nos dias 2 e 3. GAPDH foi utilizada como amostra normalizadora. (B) As barras representam a análise de densitometria de pixels como média de ARHGAP21/GAPDH. Células HEL controle (siCTRL); células HEL silenciadas para a ARHGAP21 (siARH21).

### 4.4. Silenciamento da ARHGAP21 altera proteínas que regulam os microtúbulos durante a diferenciação megacariocítica

As células HEL silenciadas para ARHGAP21 mostraram diminuição na expressão de tubulina glu nos dias 2 e 3, em comparação com as células controle (Figura 16A-B). A tubulina glu é um marcador da estabilidade dos microtúbulos (39,40) e, portanto, é possível que os microtúbulos estejam mais instáveis nas células siARH21, quando comparado às células controle. Observamos leve diminuição da fosforilação da estatmina (p-Op18 ser16) nas células siARH21 em comparação com as células siCTRL nos dias 2 e 3 (Figura 16C).



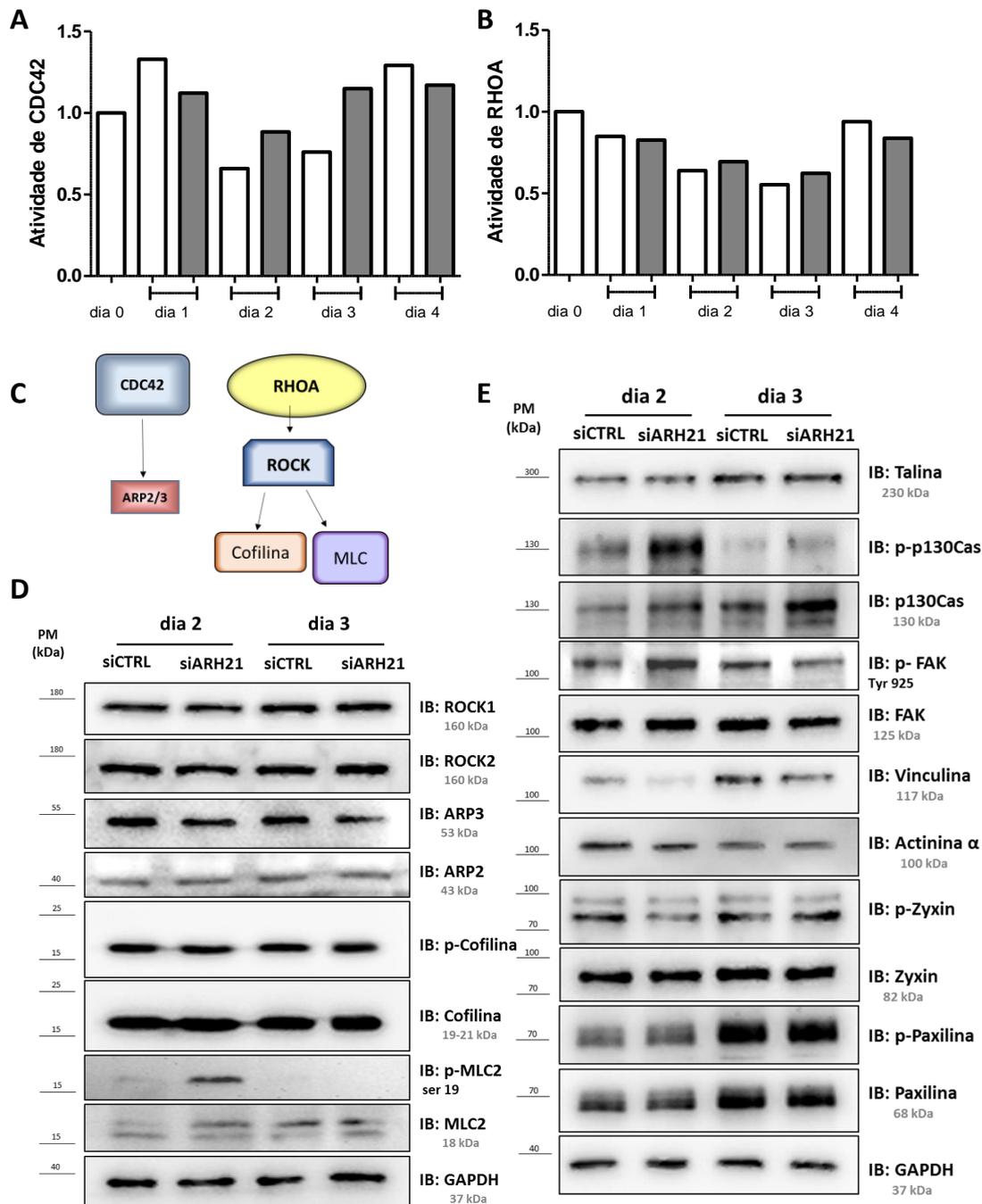
**Figura 16. Silenciamento da ARHGAP21 altera tubulina glu durante a diferenciação megacariocítica das células HEL.** (A) Análise de Western blotting da tubulina glu, tubulina alfa e p-Op18 ser16 em extratos de proteína de células HEL silenciadas para ARHGAP21 (siARH21) e controle (siCTRL) nos dias 2 e 3 de tratamento com PMA. GAPDH foi utilizada como amostra normalizadora. (B-C) A taxa de proporção da Tubulina glu/Tubulina alfa e taxa de proporção da p-Op18/Op18. As barras representam a análise da alteração relativa de densitometria de pixels como média  $\pm$  DP de dois experimentos independentes. As análises quantitativas das bandas de proteínas foram realizadas com Un-Scan-It Gel 6.1 (Silk Scientific Inc.).

#### 4.5. O silenciamento da ARHGAP21 aumenta a atividade de CDC42 e altera proteínas de adesão durante a diferenciação megacariocítica

Em seguida, investigamos a atividade de RHOA e CDC42 e algumas das suas proteínas efetoras em células siARH21 e siCTRL tratadas com PMA. O silenciamento da ARHGAP21 aumentou a atividade de CDC42 (aumento de 34,25% no dia 2 e 51,11% no dia 3 de diferenciação), enquanto não foram observadas alterações na atividade de RHOA (Figura 17A-B). Avaliamos as proteínas efetoras das Rho GTPases CDC42 e RHOA nas células silenciadas para ARHGAP21 e células controle. O efetor final da via de CDC42 é ARP2/3 e os efetores finais da via RHOA são cofilina e MLC, sendo um braço da via RHOA/ROCK/Cofilina e outro braço RHOA/ROCK/MCL (Figura 17C).

Observamos ainda uma ligeira diminuição da expressão de ARP3 nas células silenciadas para ARHGAP21 nos dias 2 e 3 da diferenciação megacariocítica e aumento na fosforilação de MLC2 (p-MLC2) no dia 2. Não foram observadas alterações significativas na expressão de ROCK 1 e 2 ou na atividade da cofilina (Figura 17D).

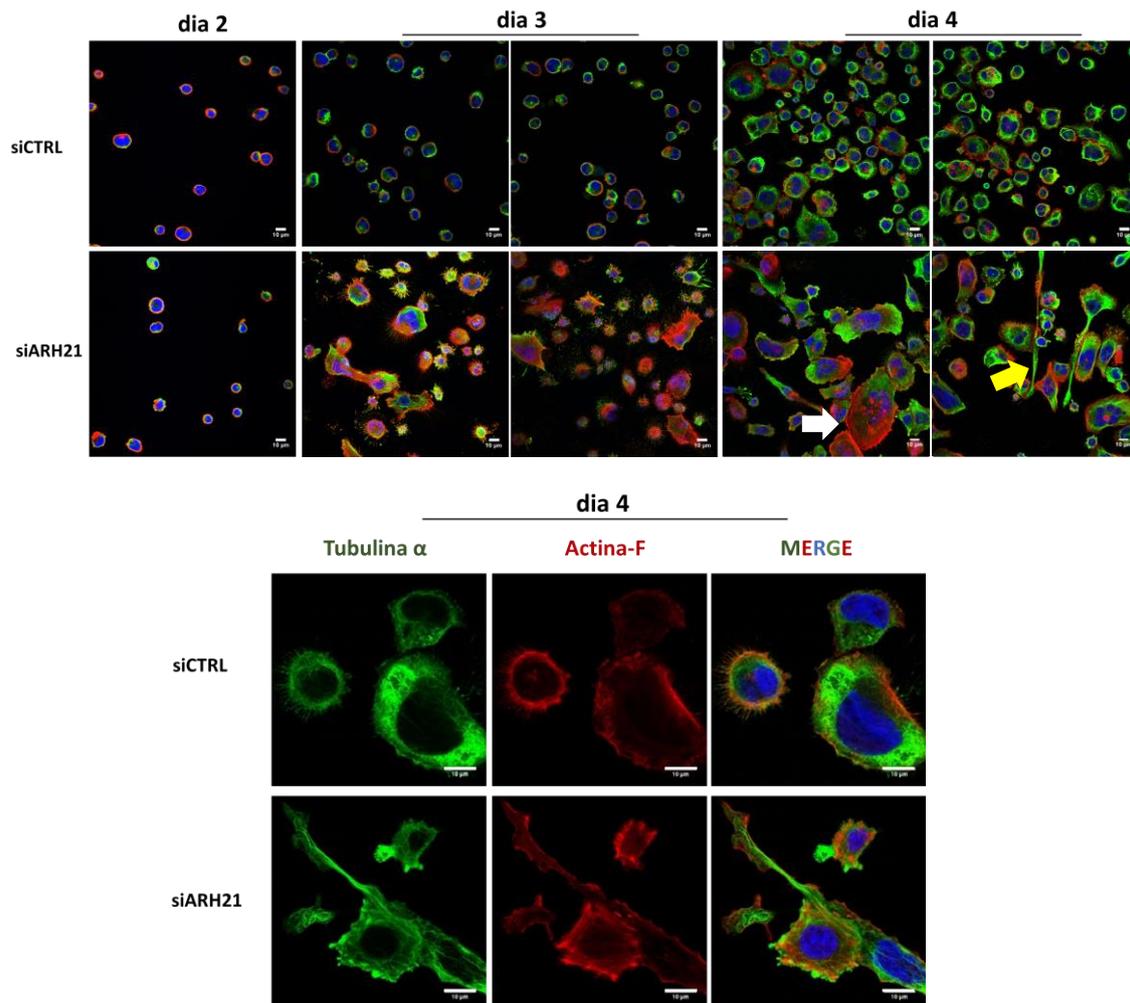
A adesão celular é um processo importante na diferenciação megacariocítica (109). Por isso examinamos em seguida a expressão e / ou fosforilação das proteínas reguladoras de adesão célula-matriz nas células silenciadas para ARHGAP21 (Figura 6). Nos dias 2 e 3 de diferenciação megacariocítica, as células silenciadas para ARHGAP21 apresentaram aumento na fosforilação da p130Cas (p-p130Cas) e diminuição na expressão de vinculina em relação às células controle. O silenciamento da ARHGAP21 levou ainda uma leve diminuição da fosforilação de zyxin (p-zyxin) no dia 2. A fosforilação de FAK925 (p-FAK925) aumentou no dia 2 e diminuiu no dia 3, em células siARH21 em comparação com as células controle. Não foi observada alteração na expressão de paxilina, talina e actinina alfa comparando as células silenciadas para ARHGAP21 e as células controle (Figura 17E).



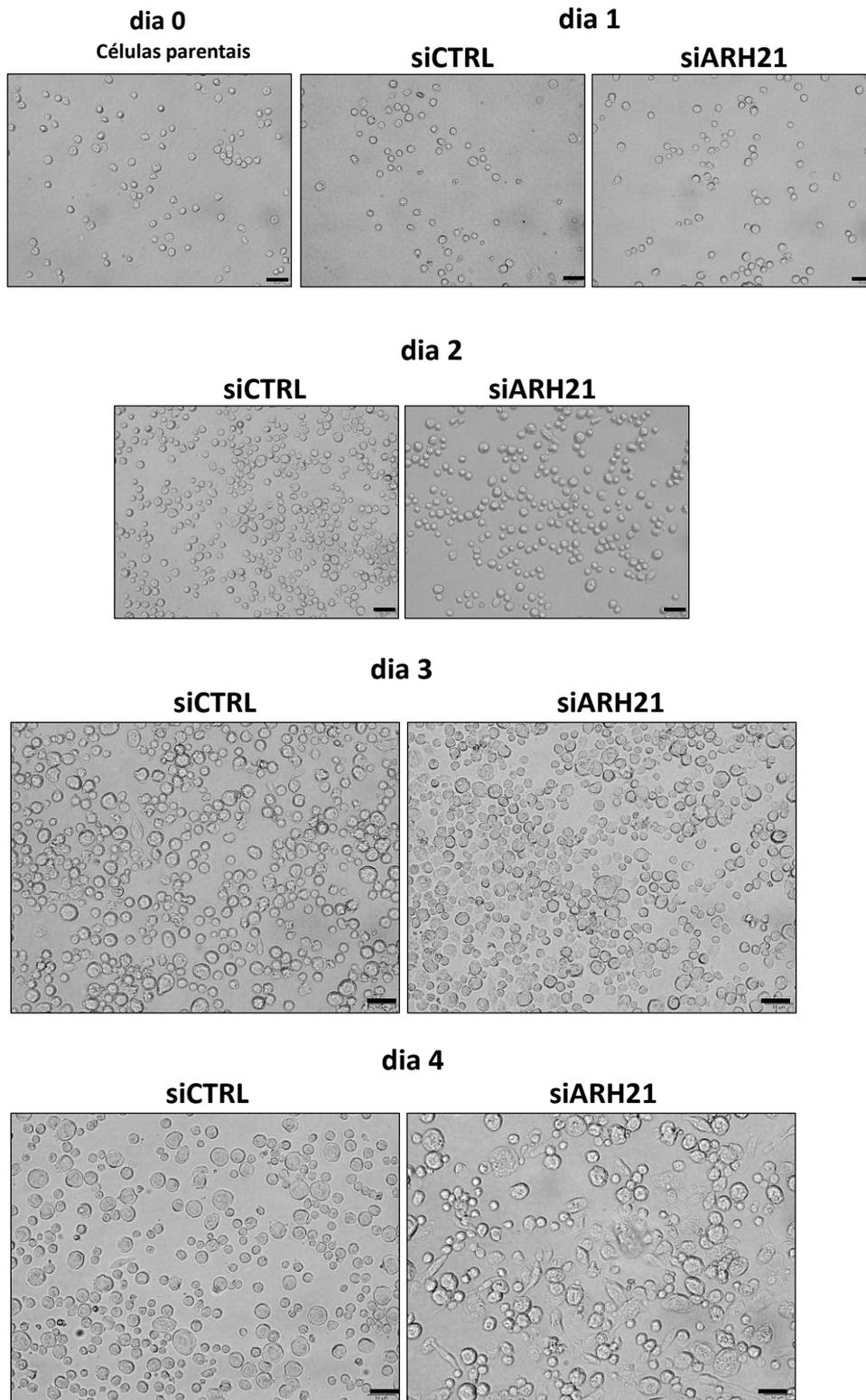
**Figura 17. O silenciamento da ARHGAP21 em células HEL altera a atividade de CDC42 e proteínas de adesão durante a diferenciação megacariocítica.** (A-B) Células HEL silenciadas para ARHGAP21 mostraram aumento da atividade de CDC42 nos dias 2 e 3 de diferenciação megacariocítica, mas sem alteração da atividade de RHOA. Os gráficos de barra representam a média da replicata de um experimento. (C) Diagrama simplificado representando a via de sinalização das Rho GTPases CDC42 e RHOA. (D) Expressão das proteínas efetoras de CDC42 e RHOA. (E) Atividade e expressão das proteínas de adesão em células silenciadas para ARHGAP21 e controle nos dias 2 e 3 de diferenciação megacariocítica. GAPDH foi utilizada como amostra normalizadora.

#### 4.6. Células HEL silenciadas para ARHGAP21 apresentam aumento de área, polaridade e protrusões durante a diferenciação megacariocítica

O rearranjo das proteínas citoesqueléticas das células HEL silenciadas para ARHGAP21 e submetidas à diferenciação megacariocítica também foi visualizada por microscopia confocal. As células silenciadas para ARHGAP21 apresentaram maior espalhamento na placa de cultura e aumento de projeções da membrana (protrusões) em comparação com as células controle (Figura 18 e Figura 19).

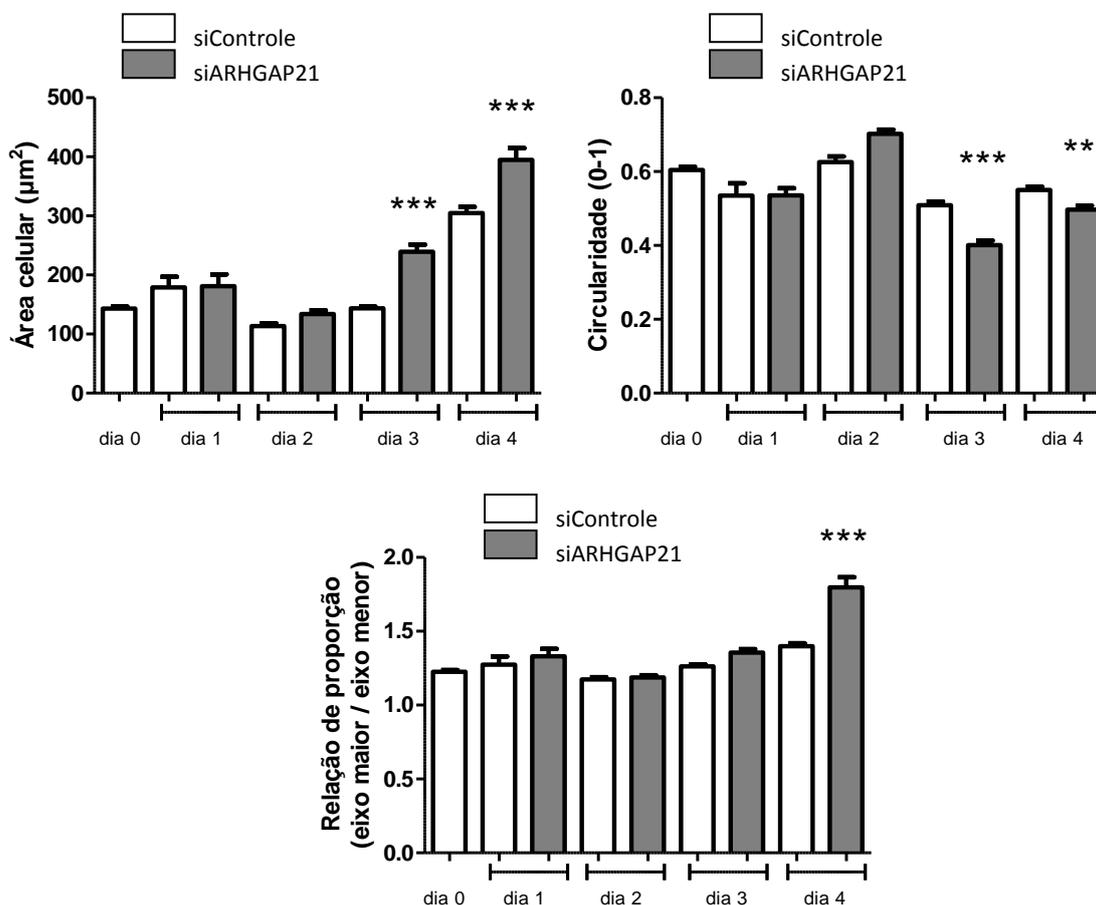


**Figura 18. O silenciamento da ARHGAP21 altera a morfologia das células HEL durante a diferenciação megacariocítica.** (A) Imagens de confocal de células HEL silenciadas para ARHGAP21 cultivadas em lâminas revestidas de colágeno, objetiva 20X (painel superior) e objetiva 63X (painel inferior). Tubulina alfa (em verde), actina-F (vermelho) e núcleo (DAPI em azul). Merge representa a sobreposição de todas as imagens. A seta branca indica polaridade e a seta amarela indica protrusão em células silenciadas para ARHGAP21 no dia 4 de diferenciação (painel superior). Barra de escala, 10  $\mu$ m.



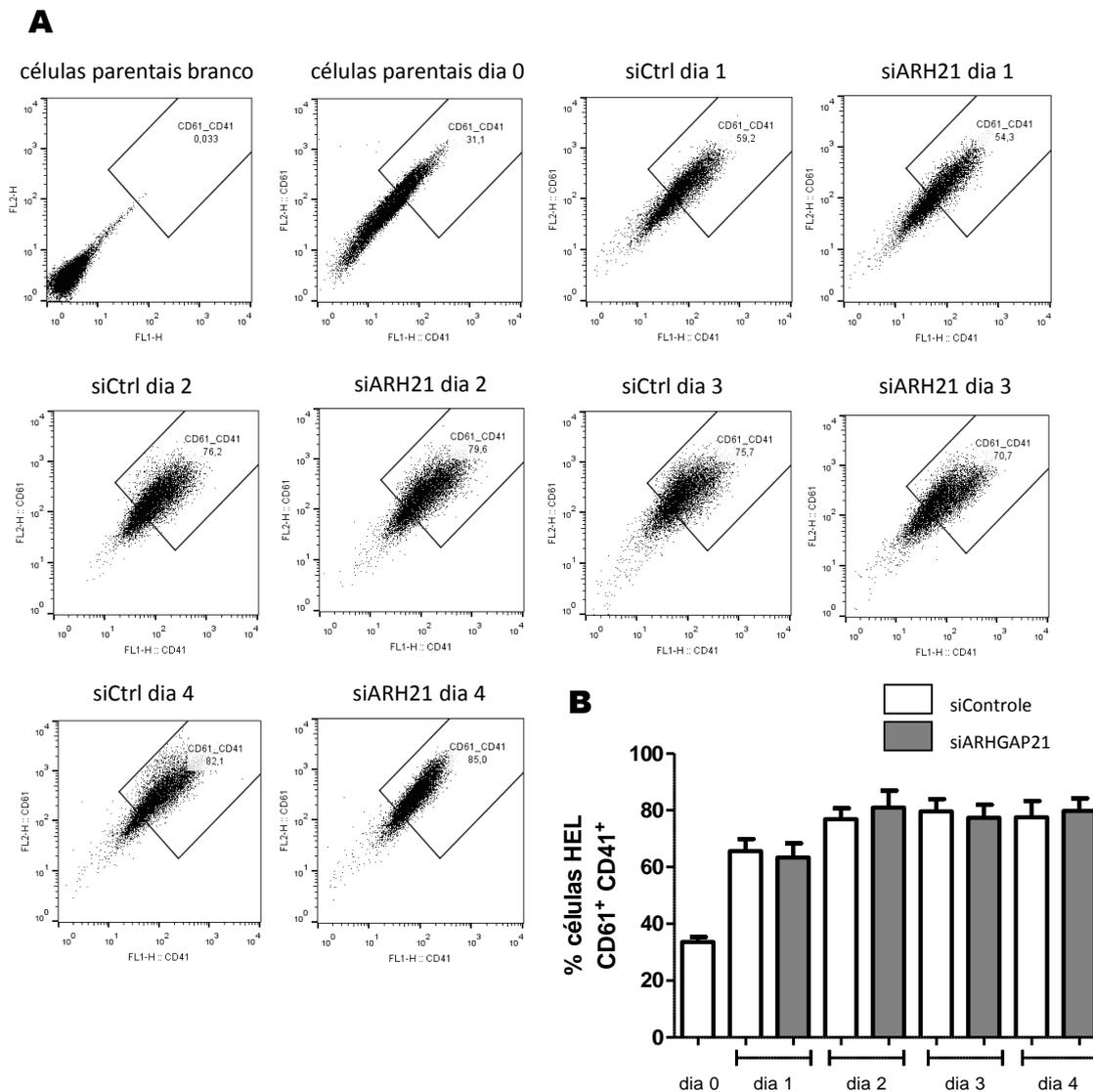
**Figura 19. O silenciamento da ARHGAP21 altera a morfologia das células HEL durante a diferenciação megacariocítica.** (A) Microscopia de luz de células de controle HEL (siCTRL) e silenciadas para ARHGAP21 (siARH21) durante a diferenciação megacariocítica. Objetiva 20X. Barra de escala, 50 $\mu$ m.

As análises com o software ImageJ mostraram que as células siARH21 apresentaram aumento da área celular e diminuição da circularidade nos dias 3 e 4 em comparação às células controle. A relação de proporção (eixo maior/eixo menor), que está associada à formação de protrusão, aumentou no dia 4 de diferenciação (Figura 20).

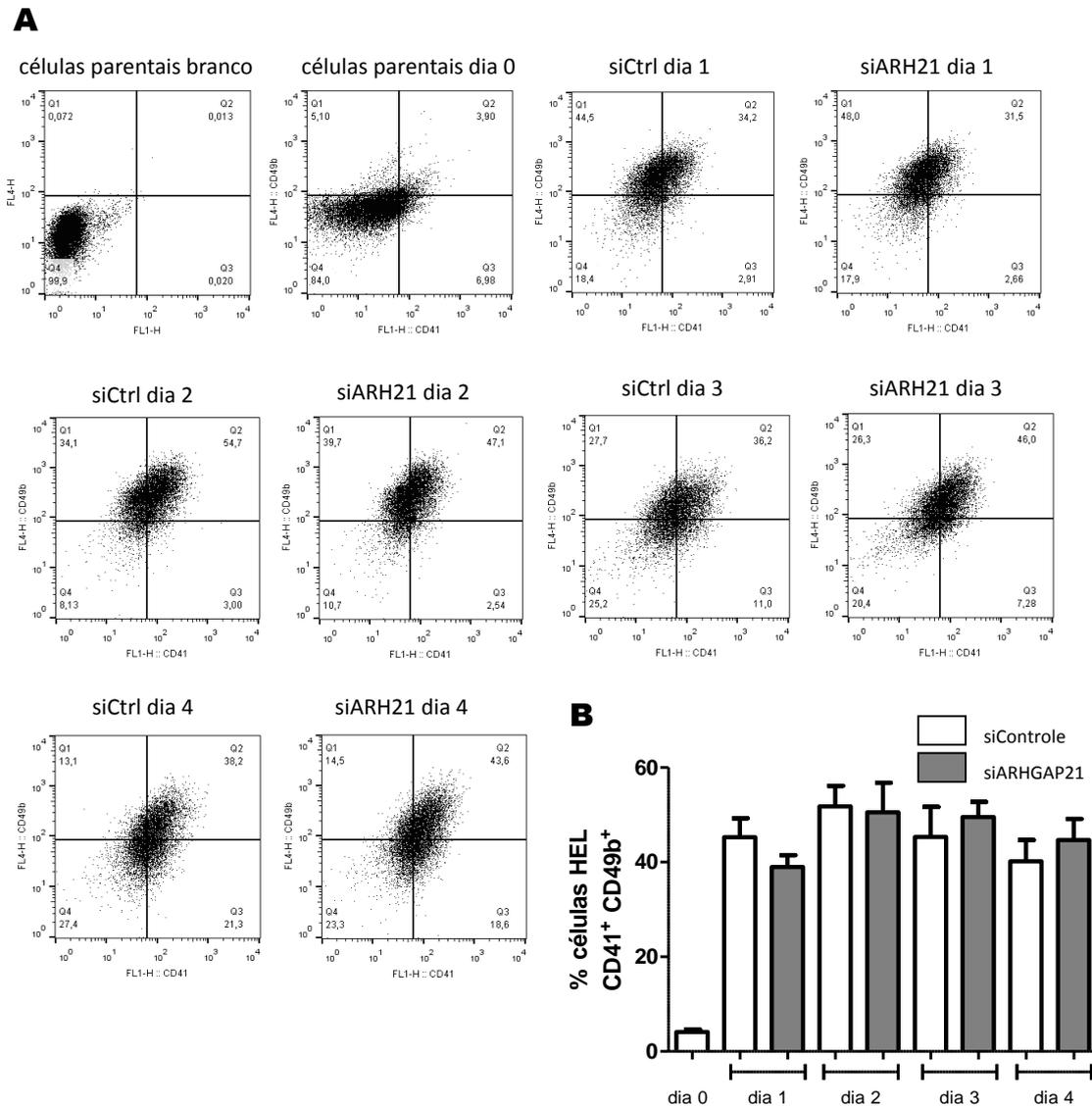


**Figura 20. Células HEL silenciadas para ARHGAP21 apresentam aumento da área celular e mais protrusões no processo de diferenciação megacariocítica.** Análise da área celular, circularidade e relação de proporção das células siControl e siARHGAP21 durante o processo de diferenciação, usando o software ImageJ. O gráfico de barras representa a média  $\pm$  desvio padrão de 3 experimentos independentes; teste *One-way Anova com análise Tukey's Multiple Comparison* para determinar diferenças estatisticamente significativas entre os valores médios de grupos diferentes, \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ .

Células HEL adquirem maior expressão de CD61, CD41 e CD49b durante a diferenciação (51,110) e, portanto, nós analisamos a presença desses marcadores por citometria de fluxo. Como esperado, houve um aumento da expressão desses marcadores nas células controle ao longo da diferenciação megacariocítica, e o silenciamento da ARHGAP21 não alterou a porcentagem de CD61<sup>+</sup>CD41<sup>+</sup> ou CD41<sup>+</sup>CD49b<sup>+</sup> (Figura 21 e Figura 22).

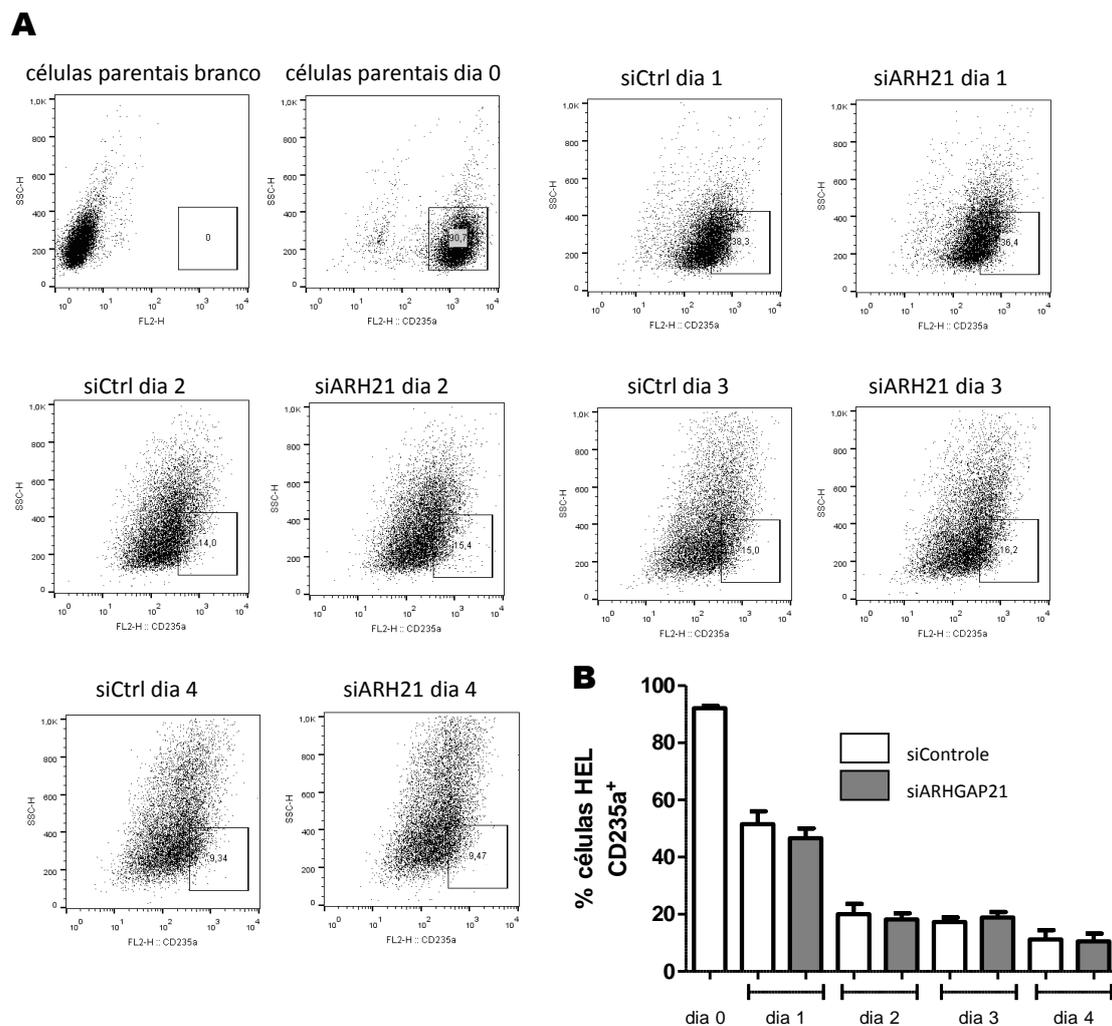


**Figura 21. O silenciamento da ARHGAP21 não altera a porcentagem de células positivas para dupla marcação CD61 e CD41 na diferenciação megacariocítica das células HEL. (A)** Representação da análise por citometria de fluxo das células HEL controle e silenciadas para ARHGAP21 no processo de diferenciação megacariocítica para os marcadores CD61<sup>+</sup>CD41<sup>+</sup> de quatro experimentos independentes. **(B)** Análise da citometria de fluxo para CD61<sup>+</sup>CD41<sup>+</sup> em células HEL silenciadas para ARHGAP21 e controle. Gráfico de barras da média  $\pm$  DP da porcentagem das células positivas.



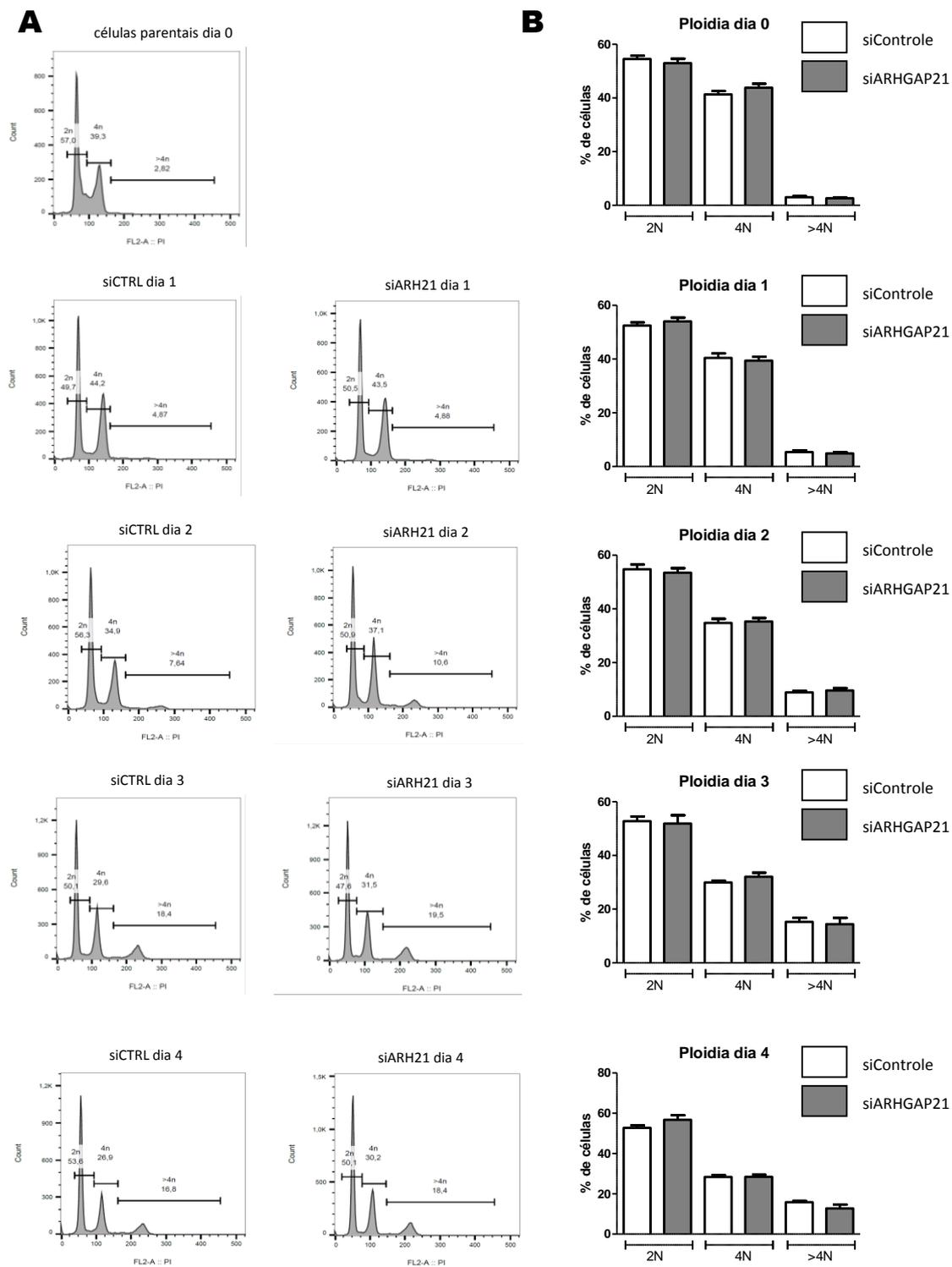
**Figura 22.** O silenciamento da ARHGAP21 não altera a porcentagem de células positivas para dupla marcação CD41 e CD49b na diferenciação megacariocítica das células HEL. (A) Representação da análise por citometria de fluxo das células HEL controle e silenciadas para ARHGAP21 no processo de diferenciação megacariocítica para os marcadores CD41<sup>+</sup>CD49b<sup>+</sup> de quatro experimentos independentes. (B) Análise da citometria de fluxo para CD41<sup>+</sup>CD49b<sup>+</sup> em células HEL silenciadas para ARHGAP21 e controle. Gráfico de barras da média  $\pm$  DP da porcentagem das células positivas.

A diminuição na porcentagem de células siCTRL e siARH21 que expressam CD235a (glicoforina A) confirmou a eficiência da diferenciação megacariocítica (Figura 23).



**Figura 23. Diminuição da porcentagem de células positivas para CD235a nas células HEL controle e silenciadas para ARHGAP21 durante o processo de diferenciação.** (A) Representação da análise por citometria de fluxo das células HEL controle e silenciadas para ARHGAP21 no processo de diferenciação megacariocítica para marcação CD235a de quatro experimentos independentes. (B) Análise da citometria de fluxo para CD235a em células HEL silenciadas para ARHGAP21 e controle. Gráfico de barras da média  $\pm$  DP da porcentagem das células positivas.

A ploidia também não foi afetada pelo silenciamento da ARHGAP21 (Figura 24).

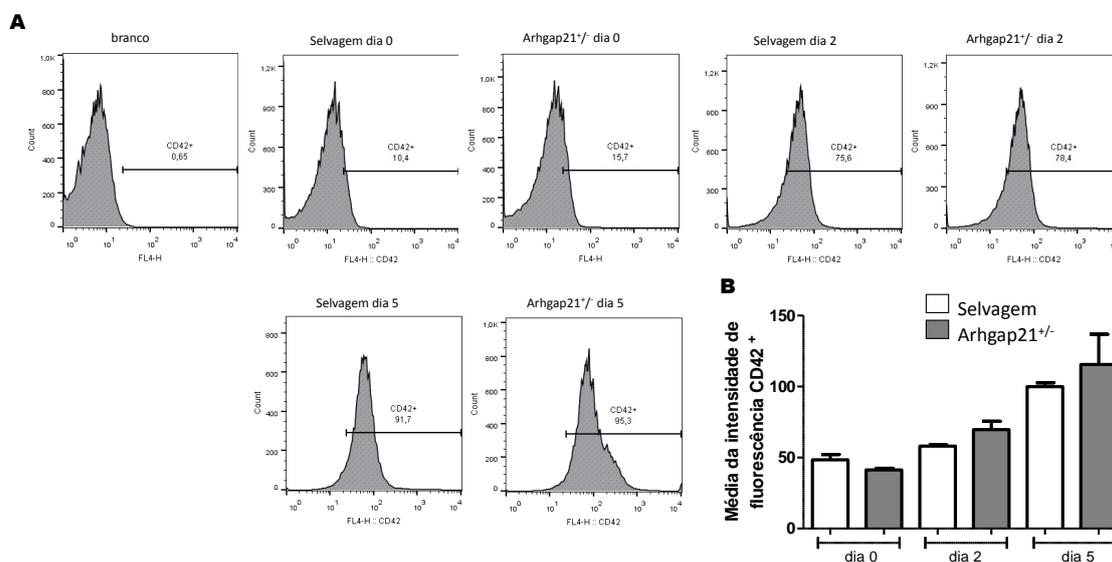


**Figura 24. Ploidia não é alterada no processo de diferenciação megacariocítica em células silenciadas para ARHGAP21 e controle.** (A) Histograma representativo para o conteúdo de DNA 2N, 4N e mais de 4N das células HEL silenciadas para ARHGAP21 e controle ao longo do processo de diferenciação de quatro experimentos independentes. (B) Análise da porcentagem das células HEL silenciadas para ARHGAP21 e controle mostrando a ploidia com 2N, 4N e mais que 4N. Gráfico de barras da média  $\pm$  DP da porcentagem das células positivas.

## PARTE 2. Estudo do papel da ARHGAP21 durante a diferenciação megacariocítica *ex vivo*

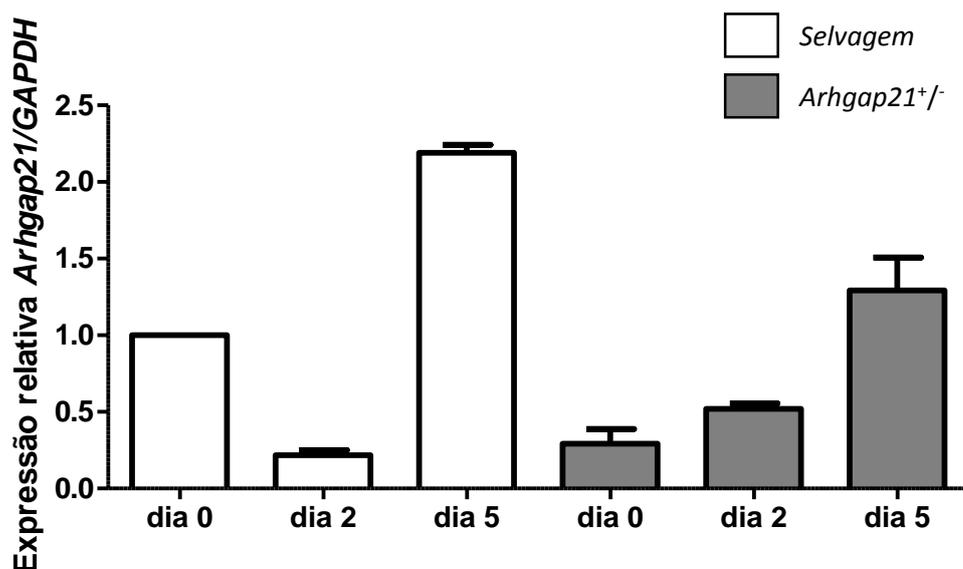
### 4.7. Células da medula óssea de camundongos *Arhgap21*<sup>+/-</sup> submetidas à diferenciação megacariocítica apresentam maior espalhamento na cultura *in vitro*

Nós investigamos ainda a diferenciação megacariocítica de células primárias da medula óssea de camundongos *Arhgap21*<sup>+/-</sup>. A eficácia da diferenciação foi confirmada pelo aumento da expressão de CD42 nas células dos camundongos selvagens e dos camundongos *Arhgap21*<sup>+/-</sup> (Figura 25).



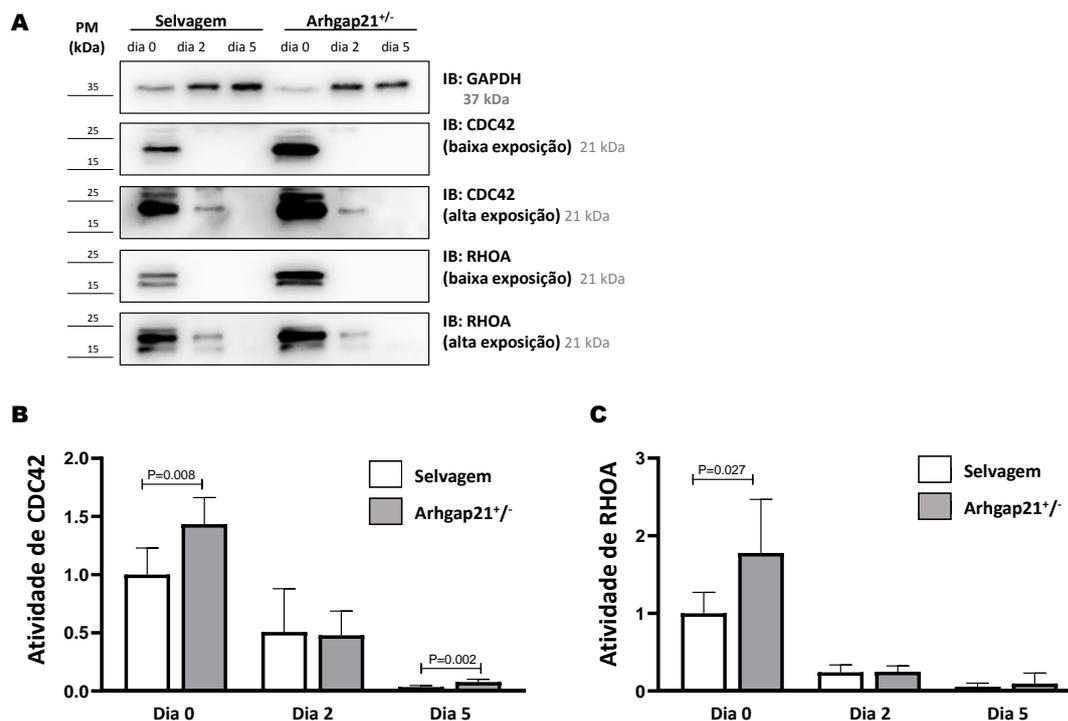
**Figura 25.** Aumento da média da intensidade de fluorescência de CD42 para células *Arhgap21*<sup>+/-</sup> e do tipo selvagem confirma o processo de diferenciação megacariocítica. (A) Representação da análise por citometria de fluxo da expressão de CD42 durante a diferenciação megacariocítica das células *Arhgap21*<sup>+/-</sup> e do tipo selvagem. (B) Análise da citometria de fluxo da expressão CD42 durante a diferenciação megacariocítica das células dos camundongos *Arhgap21*<sup>+/-</sup> e do tipo selvagem. Gráfico de barras da média  $\pm$  DP da média da intensidade de fluorescência.

Em concordância com os resultados obtidos com as células HEL, a expressão do gene *Arhgap21* aumentou após a diferenciação de células primárias de camundongo (Figura 26).



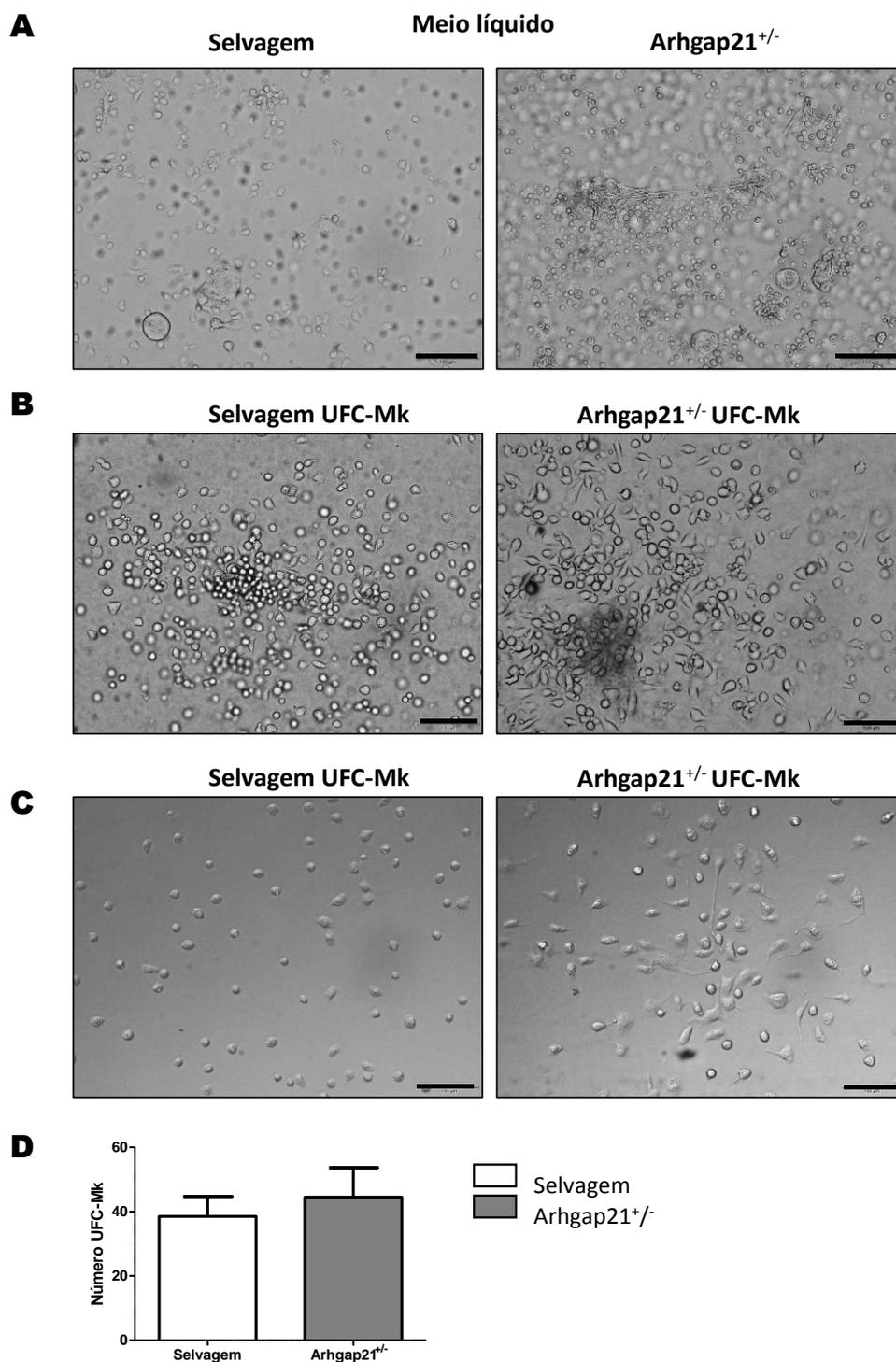
**Figura 26.** A proteína *Arhgap21* é expressa em células primárias de camundongo durante a diferenciação megacariocítica. Expressão relativa do gene *ARHGAP21* durante a diferenciação megacariocítica. *GAPDH* foi usado como gene normalizador. As células dos camundongos do tipo selvagem no dia zero de diferenciação receberam o valor arbitrário de 1. O gráfico mostra a média  $\pm$  DP de três experimentos independentes.

A expressão de CDC42 e RHOA diminuiu durante a diferenciação megacariocítica, sendo que as células da medula óssea de camundongos *Arhgap21*<sup>+/-</sup> mostraram expressão aumentada de ambas as proteínas antes da diferenciação (dia 0) em comparação com as células dos camundongos do tipo selvagem (Figura 27A). Resultados semelhantes foram observados quando analisamos as atividades de CDC42 e RHOA (Figura 27B-C).



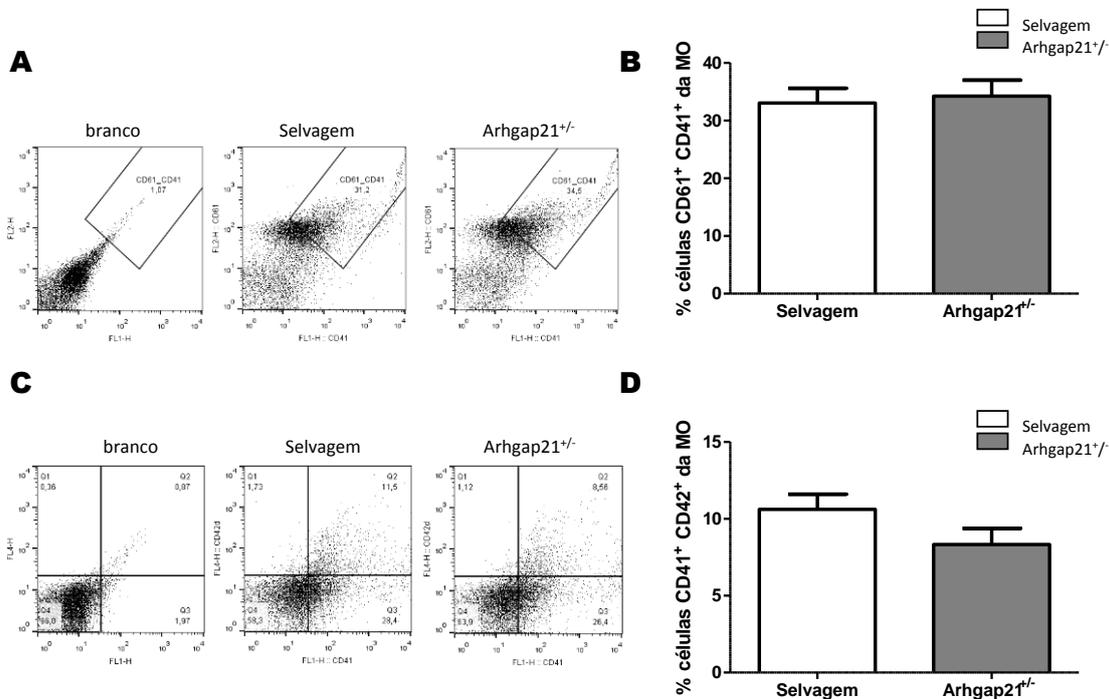
**Figura 27.** Aumento da expressão e atividade de CDC42 e RHOA das células da medula óssea dos camundongos Arhgap21<sup>+/-</sup> em comparação com as células dos camundongos do tipo selvagem no dia zero. (A) Análise de Western blotting de CDC42 e RHOA durante a diferenciação megacariocítica. GAPDH foi usado como amostra normalizadora. (B-C) Atividade relativa de CDC42 e RHOA durante a diferenciação megacariocítica. A média das atividades de CDC42 e RHOA das células do tipo selvagem do dia zero que receberam valor arbitrário 1. Os gráficos mostram a média  $\pm$  DP de três experimentos independentes. Teste *t Student Two tailed*.

A microscopia óptica no dia 5 de diferenciação mostrou maior espalhamento das células Arhgap21<sup>+/-</sup> no frasco de cultura em comparação com as células do tipo selvagem, quando foram cultivadas em meio líquido (Figura 28A). A unidade formadora de colônia de megacariócitos (UFC-Mk) das células Arhgap21<sup>+/-</sup> também apresentou mais espalhamento em comparação com UFC-Mk das células do tipo selvagem (Figura 28B-C). No entanto, nenhuma diferença foi observada no número de colônias (Figura 28D).



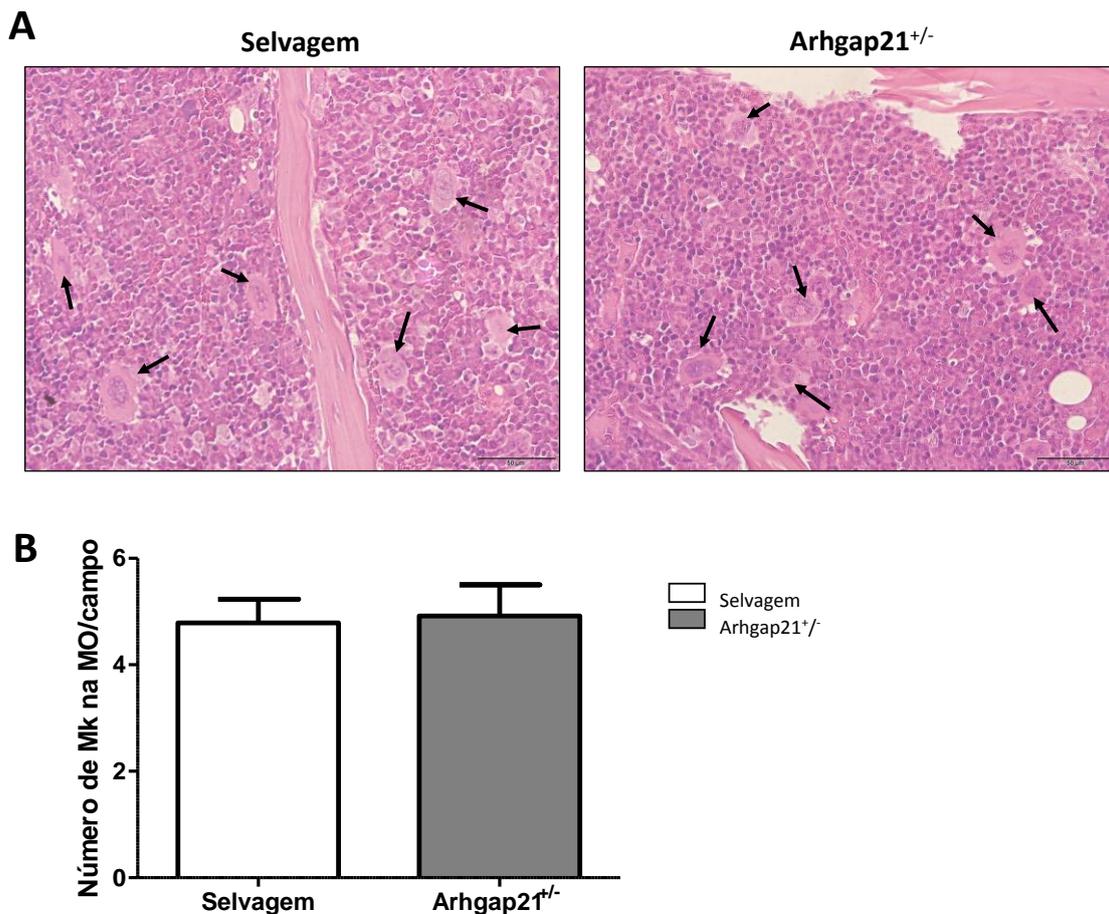
**Figura 28. Diferenciação megacariocítica das células progenitoras Arhgap21<sup>+/-</sup> exibem mais espalhamento na cultura em comparação com as células progenitoras do tipo selvagem.** (A) Morfologia das células da medula óssea da Arhgap21<sup>+/-</sup> e do tipo selvagem no dia 5 de diferenciação em meio líquido. (B-C) UFC-Mk das células da medula óssea da Arhgap21<sup>+/-</sup> e do tipo selvagem em meio semi sólido MegaCult-C. O espalhamento é aumentado nas células Arhgap21<sup>+/-</sup>. Objetivo 20x. Barra de escala, 100  $\mu$ m. (D) Média e desvio padrão dos números de UFC-Mk em MegaCult-C obtidos das células da medula óssea de camundongos Arhgap21<sup>+/-</sup> e do tipo selvagem (selvagem 38,50  $\pm$  6,228; Arhgap21<sup>+/-</sup> 44,50  $\pm$  9,179; N = 6 camundongos / genótipo).

Os megacariócitos foram identificados por citometria de fluxo através das populações que expressam CD61/CD41 ou CD41/CD42. Não foi observada diferença na porcentagem de células da medula óssea CD61<sup>+</sup> CD41<sup>+</sup> ou CD41<sup>+</sup> CD42<sup>+</sup> isoladas diretamente de camundongos Arhgap21<sup>+/-</sup> e do tipo selvagem (Figura 29).



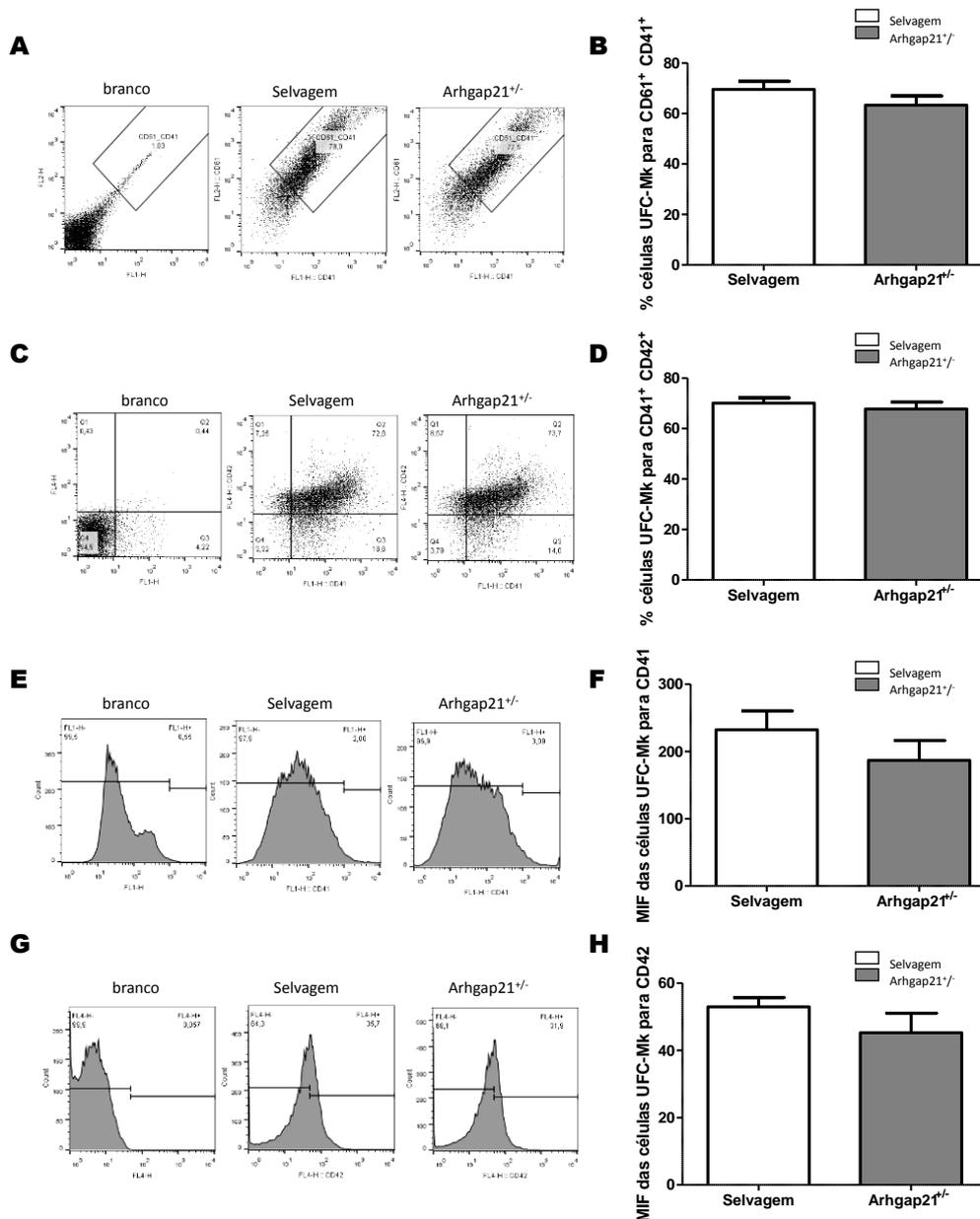
**Figura 29. Arhgap21<sup>+/-</sup> não apresenta diferença significativa nas populações CD61<sup>+</sup> CD41<sup>+</sup> e CD41<sup>+</sup>CD42<sup>+</sup> da medula óssea.** (A) Representação da análise da porcentagem de CD61<sup>+</sup>CD41<sup>+</sup> das células da MO dos camundongos Arhgap21<sup>+/-</sup> e do tipo selvagem. (B) Gráfico de barras da média de porcentagem de células CD61<sup>+</sup>CD41<sup>+</sup>; selvagem 33,07 ± 2,541; Arhgap21<sup>+/-</sup> 34,23 ± 2,772. (C) Representação da análise da porcentagem de CD41<sup>+</sup>CD42<sup>+</sup> das células da MO dos camundongos Arhgap21<sup>+/-</sup> e do tipo selvagem. (D) Gráfico de barras da média de porcentagem de células CD41<sup>+</sup> CD42<sup>+</sup>; selvagem 10,62 ± 0,9850; Arhgap21<sup>+/-</sup> 8,330 ± 1,052. Medido por citometria de fluxo (n = 3 camundongos / genótipo).

O número de megacariócitos na medula óssea também foi semelhante entre camundongos do tipo selvagem e Arhgap21<sup>+/-</sup> (Figura 30A-B).



**Figura 30. Arhgap21<sup>+/-</sup> não altera a quantidade de megacariócitos na MO.** (A) Imagem representativa da histologia da medula óssea de fêmur corado com hematoxilina e eosina obtida dos camundongos Arhgap21<sup>+/-</sup> e do tipo selvagem. Setas pretas indicam megacariócitos. Objetiva 40x, escala 50  $\mu$ m. (B) Média e desvio padrão do número de megacariócitos na medula óssea dos camundongos Arhgap21<sup>+/-</sup> e do tipo selvagem (selvagem  $4.787 \pm 0.4464$ ; Arhgap21<sup>+/-</sup>  $4.400 \pm 0.3396$ ; N = 5 camundongos / genótipo).

As colônias de células da medula óssea dos camundongos Arhgap21<sup>+/-</sup> e do tipo selvagem cultivadas em meio metilcelulose suplementado com fatores de crescimento e TPO também não apresentaram expressão diferente dos marcadores CD61<sup>+</sup> CD41<sup>+</sup> ou CD41<sup>+</sup>CD42<sup>+</sup> (Figura 31A-H).



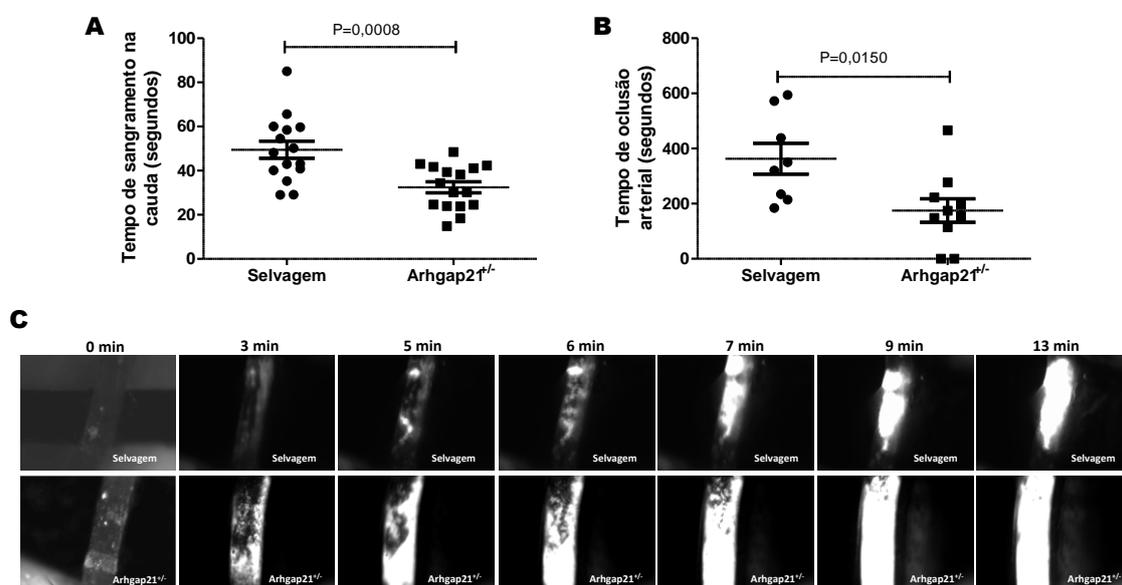
**Figura 31. Arhgap21<sup>+/-</sup> para UFC-Mk não apresenta diferença significativa nas populações CD61<sup>+</sup>CD41<sup>+</sup> e CD41<sup>+</sup>CD42<sup>+</sup> da MO.** (A) Representação da análise da porcentagem de células UFC-Mk para CD61<sup>+</sup>CD41<sup>+</sup> obtido através da cultura de células da MO em meio de metilcelulose suplementado com citocinas específicas e TPO. (B) Gráfico de barras da média da porcentagem de células UFC-Mk para CD61<sup>+</sup>CD41<sup>+</sup>; selvagem 69,54 ± 3,199; Arhgap21<sup>+/-</sup> 63,28 ± 3,658. (C) Representação da análise da porcentagem de células UFC-Mk para CD41<sup>+</sup>CD42<sup>+</sup>, o mesmo UFC-Mk cultivado acima. (D) Gráfico de barras da média da porcentagem de células UFC-Mk para CD41<sup>+</sup>CD42<sup>+</sup>; selvagem 70,09 ± 2,079; Arhgap21<sup>+/-</sup> 67,76 ± 2,757. (E) Representação da análise da média da intensidade de fluorescência (MIF) de CD41, mesmo UFC-Mk cultivado acima. (F) Gráfico de barras da MIF de CD41; selvagem 232,3 ± 28,07; Arhgap21<sup>+/-</sup> 186,9 ± 29,37. (G) Representação da análise da MIF de CD42, mesmo UFC-Mk cultivado acima. (H) Gráfico de barras da MIF de CD42; selvagem 52,96 ± 2,775; Arhgap21<sup>+/-</sup> 45,25 ± 5,806. Medido por citometria de fluxo (n = 10 camundongos / genótipo).

### PARTE 3. Estudo do papel da ARHGAP21 no processo hemostático *in vivo*

#### 4.8. Camundongos *Arhgap21*<sup>+/-</sup> apresentam menor tempo de sangramento na cauda e acelerada oclusão da artéria carótida

Para avaliar a função da *Arhgap21* na hemostasia, avaliamos o tempo de sangramento da veia na cauda e a formação de trombo após lesão da artéria carótida por  $\text{FeCl}_3$ . O tempo de sangramento de camundongos *Arhgap21*<sup>+/-</sup> foi significativamente diminuído em comparação com do tipo selvagem (*Arhgap21*<sup>+/-</sup>  $32,44 \pm 2,502$  e selvagem  $49,48 \pm 3,857$  segundos,  $P = 0,0008$ ) (Figura 32A).

O tempo para oclusão da artéria carótida após a lesão induzida por  $\text{FeCl}_3$  foi duas vezes mais rápido em camundongos *Arhgap21*<sup>+/-</sup> do que em camundongos do tipo selvagem, causando a morte de dois animais *Arhgap21*<sup>+/-</sup> (*Arhgap21*<sup>+/-</sup>  $175,1 \pm 42,67$  e selvagem  $363,3 \pm 55,99$  segundos,  $P = 0,0150$ ) (Figura 32B). A microscopia de fluorescência intravital revelou plaquetas e glóbulos brancos aderidos à parede do vaso após a lesão. Os camundongos *Arhgap21*<sup>+/-</sup> apresentaram área de trombo visivelmente aumentada ao longo do tempo em comparação com os camundongos do tipo selvagem, e oclusão completa após aproximadamente 13 minutos de lesão (Figura 32C).

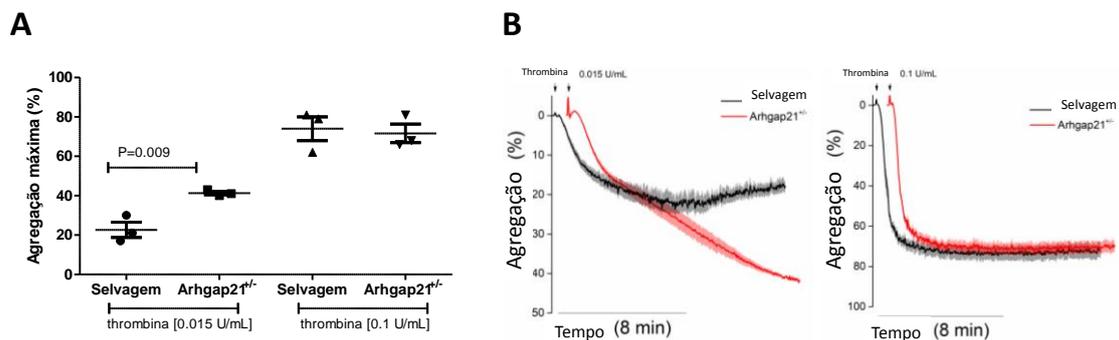


**Figura 32. Camundongos *Arhgap21*<sup>+/-</sup> exibem menor tempo de sangramento na cauda e acelerada formação de trombo após lesão arterial da carótida induzida por  $\text{FeCl}_3$ .** (A) Tempo de sangramento da veia caudal de camundongos selvagens e *Arhgap21*<sup>+/-</sup>. O gráfico de pontos mostra resultados individuais. As linhas horizontais representam a média  $\pm$  DP. (selvagem  $49,48 \pm 3,857$  N = 15; *Arhgap21*<sup>+/-</sup>  $32,44 \pm 2,502$  N = 16;  $P = 0,0008$ ; Teste *t Student Two tailed*). (B) Tempo para a oclusão da carótida após lesão com  $\text{FeCl}_3$  em camundongos

selvagens e Arhgap21<sup>+/-</sup>. O gráfico de pontos mostra resultados individuais. As linhas horizontais representam a média  $\pm$  DP (selvagem 363,3  $\pm$  55,99, N = 8; Arhgap21<sup>+/-</sup> 175,1  $\pm$  42,67, N = 10; Teste *t Student Two tailed*). (C) Resultado representativo da microscopia intravital da formação de trombo dos camundongos tipo selvagem e Arhgap21<sup>+/-</sup> nos tempos indicados. O trombo parece fluorescente com Rodamina 6G que marca plaquetas e leucócitos.

#### 4.9. Plaquetas de camundongos Arhgap21<sup>+/-</sup> apresentam aumento da agregação e tamanho dos grânulos

Em seguida, avaliamos os efeitos da deficiência da Arhgap21 na agregação plaquetária em resposta à trombina. Com uma dose mais baixa de agonista (0,015 U/mL de trombina) observamos um aumento significativo na agregação de plaquetas Arhgap21<sup>+/-</sup> (agregação máxima média = 41%  $\pm$  DP 6,6%) em comparação as plaquetas controle (22%  $\pm$  6,6%) (P = 0,009). Não houve diferença significativa na agregação plaquetária observada em resposta a uma dose mais alta do agonista (trombina 0,1 U/mL) (79%  $\pm$  10% para Arhgap21<sup>+/-</sup> e 68%  $\pm$  8% para tipo selvagem) (Figura 33A-B).

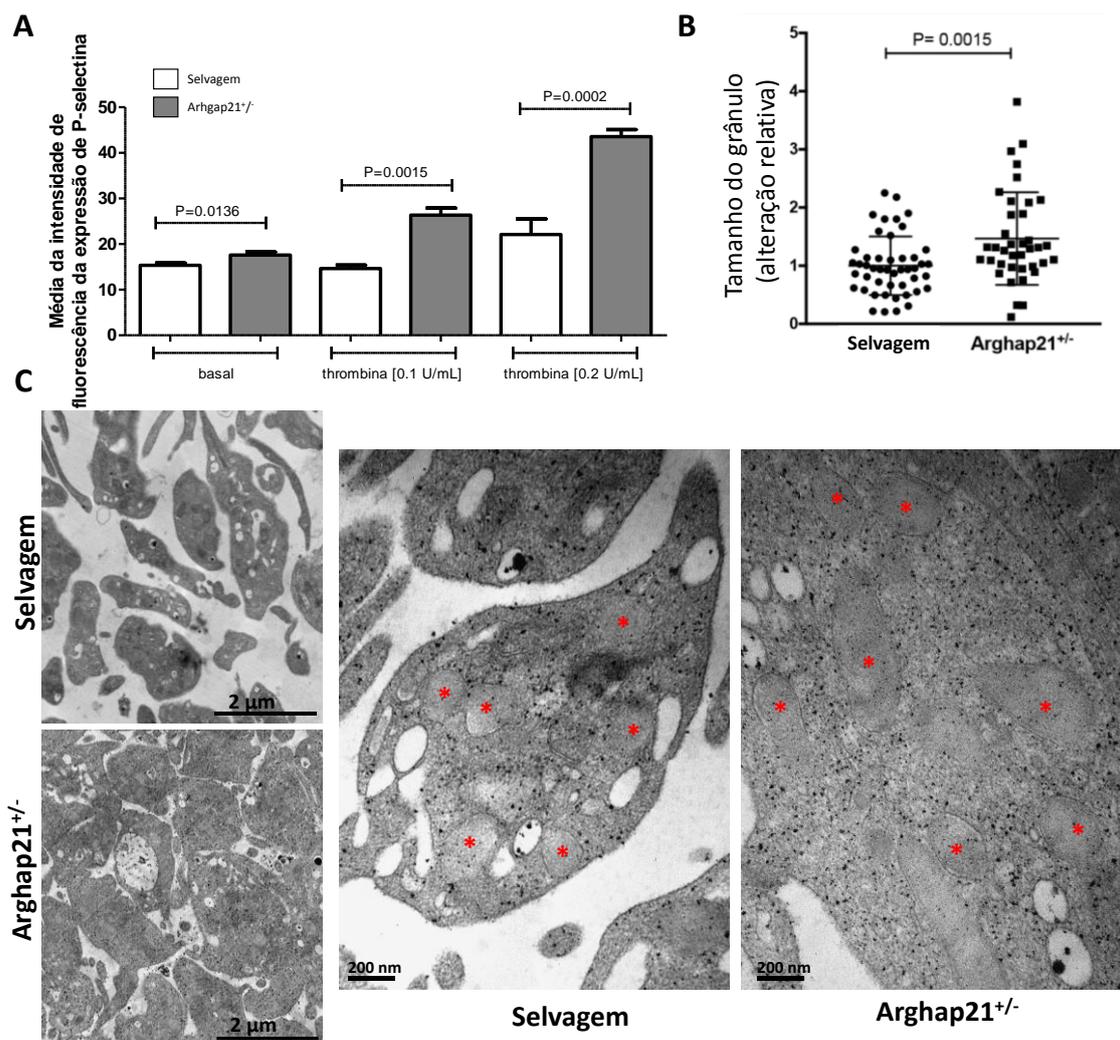


**Figura 33. As plaquetas Arhgap21<sup>+/-</sup> apresentam aumento na agregação.** (A) Agregação máxima de plaquetas lavadas Arhgap21<sup>+/-</sup> e do tipo selvagem induzida com trombina. Os valores foram obtidos por agregometria. Cada ponto representa a medição de uma amostra individual e a linha horizontal é a média das amostras  $\pm$  DP. (B) Curvas de agregação de 3 experimentos individuais (média  $\pm$  DP) com plaquetas Arhgap21<sup>+/-</sup> e do tipo selvagem estimuladas com trombina.

A exposição à superfície da p-selectina também foi determinada em plaquetas dos dois grupos de camundongos. Notavelmente, plaquetas Arhgap21<sup>+/-</sup> mostraram aumento da exposição à p-selectina, mesmo na ausência do agonista (P = 0,0136). A estimulação com 0,1 ou 0,2 U/mL de trombina aumentou a diferença na expressão de p-selectina entre plaquetas Arhgap21<sup>+/-</sup> e do tipo selvagem (P < 0,005) (Figura 34A). O

aumento da p-selectina indica mais fusão dos grânulos  $\alpha$  à membrana plasmática, aumentando a atividade das plaquetas.

A microscopia eletrônica de transmissão revelou que as plaquetas Arhgap21<sup>+/-</sup> apresentaram tamanho aumentado do grânulo  $\alpha$ , quando comparado ao tamanho dos grânulos das plaquetas do tipo selvagem (Figura 34B-C).



**Figura 34.** As plaquetas Arhgap21<sup>+/-</sup> apresentam tamanho dos grânulos aumentados. (A) Análise da citometria de fluxo da expressão de p-selectina. Os dados são da média da intensidade de fluorescência (MIF)  $\pm$  DP de pelo menos 4 camundongos por grupo. (B) Alteração relativa do tamanho dos grânulos das plaquetas dos camundongos Arhgap21<sup>+/-</sup> e do tipo selvagem (n = 3 camundongos por genótipo; número total de grânulos analisados = 79). (C) Foto representativa da microscopia eletrônica de transmissão das plaquetas dos camundongos tipo selvagem e Arhgap21<sup>+/-</sup>. Os asteriscos indicam os grânulos de plaquetas (alfa) e ilustram a diferença de tamanho dos grânulos descrito em (B). Teste *t Student Two tailed* foi usado para comparações entre os grupos Arhgap21<sup>+/-</sup> e tipo selvagem em todos os ensaios.

## 5. DISCUSSÃO

No presente estudo, nós apresentamos pela primeira vez o papel da RhoGAP ARHGAP21 na diferenciação megacariocítica e na função plaquetária, usando a diferenciação megacariocítica da linhagem celular HEL silenciada para ARHGAP21 e induzida por PMA e modelo de camundongo haploinsuficiente *Arhgap21<sup>+/-</sup>*.

Identificamos o aumento de expressão da ARHGAP21 durante a diferenciação megacariocítica das células HEL e de células primárias de camundongos, corroborando uma análise transcricional em escala genômica que mostrou o aumento do RNAm da ARHGAP21 durante a diferenciação megacariocítica da linhagem celular CHRF-288-11 e células primárias humanas (111).

Também demonstramos que o aumento da expressão da ARHGAP21 em células HEL ao longo da diferenciação megacariocítica foi acompanhado pelo aumento da expressão de proteínas do citoesqueleto, como tubulina acetilada, tubulina glu, tubulina alfa e estatmina (redução de p-Op18 ser16). O aumento da tubulina  $\alpha$  corrobora com um estudo recente que mostrou o aumento de expressão das isoformas da tubulina  $\alpha$  durante a diferenciação megacariocítica de progenitores hematopoiéticos humanos (112). A colocalização da ARHGAP21 com tubulina  $\alpha$  nas protrusões citoplasmáticas e ensaios de imunoprecipitação revelaram a interação dessas proteínas, de acordo com os nossos achados anteriores em células de câncer de próstata humano (91). A predominância da ARHGAP21 na fração insolúvel da célula sugere que ARHGAP21 está associada a microtúbulos estabilizados.

A dinâmica dos microtúbulos é controlada pelo equilíbrio da conformação da tubulina (113,114) e uma alta dinâmica é necessária para a extensão da proplaquetas. Microtúbulos estáveis acumulam modificações pós-traducionais da tubulina, como destirosinação (ou glu) e acetilação (89,115). Assim, a expressão diminuída de tubulina glu indica instabilidade dinâmica dos microtúbulos nas células silenciadas para ARHGAP21.

As Rho GTPases CDC42 e RHOA são reguladores críticos da dinâmica da actina e dos microtúbulos, interagindo com uma variedade de proteínas efetoras (36,37). Em nosso estudo, as células de camundongos *ARHGAP21<sup>+/-</sup>* apresentaram aumento da expressão e atividade de RHOA e CDC42, quando comparadas às células dos camundongos do tipo selvagem. Também observamos aumento da fosforilação da

cadeia leve da miosina 2 (MLC2) no segundo dia de diferenciação das células HEL, ou seja, quando a expressão de ARHGAP21 é máxima. MLC2 é uma proteína efetora da RHO/ROCK, que interage diretamente com os filamentos de actina para conduzir mudanças de forma, sendo essencial para o início da mudança da forma das plaquetas e contribuindo na adesão plaquetária (116).

Estudos (80) demonstraram que CDC42 e RHOA atuam como um circuito regulador da biogênese transendotelial das plaquetas. Camundongos deficientes para CDC42 mostraram alterações na ativação de plaquetas, na organização de grânulos, na desgranulação e na sinalização em GPIb (73,79). Em contraste nos camundongos para a deficiência única da RAC, a deficiência única para CDC42 reduziu significativamente a formação de proplaquetas e diminuiu o número de plaquetas. A dupla deficiência (CDC42 e RAC) potencializou esses efeitos, resultando em macrotrombocitopenia, com comprometimento da função plaquetária e apresentou morfologia anormal dos megacariócitos com defeitos acentuados na tubulina (37,73). Um modelo de camundongo com deleção para RHOA em megacariócitos e plaquetas também apresentou macrotrombocitopenia com produção de plaquetas prejudicadas (117). Além disso, o tempo de sangramento caudal prolongado e a formação de trombo defeituoso foram relatados em camundongos com deficiência para RHOA específica nos megacariócitos. O espalhamento das plaquetas RHOA<sup>-/-</sup> apresentou alteração na organização dos microtúbulos, enquanto a agregação não foi alterada em resposta à trombina (118). Esses estudos indicam que os efeitos do silenciamento da Arhgap21 aqui observados possivelmente resultam da combinação da desregulação de RHOA e CDC42, em conjunto com outras proteínas diretamente associadas à ARHGAP21, como tubulina  $\alpha$  e proteínas de adesão.

Corroborando com os nossos dados, um estudo recente realizado por Tobias Heib et al mostrou que a sinalização RHOA e CDC42 é um pré-requisito para a maturação do citoplasma de megacariócitos e proplaquetas, mas não da endomitose. Durante a maturação citoplasmática, a dupla deficiência para RHOA e CDC42 proporcionou o desequilíbrio de isoformas de tubulina, com a redução em tubulina  $\beta$ 1 e aumento da tubulina  $\alpha$ 4a, os quais têm sido associados com a diminuição da tubulina destirosinada e aumento da tubulina tirosina, contribuindo para o defeito na formação de proplaquetas e plaquetas (83).

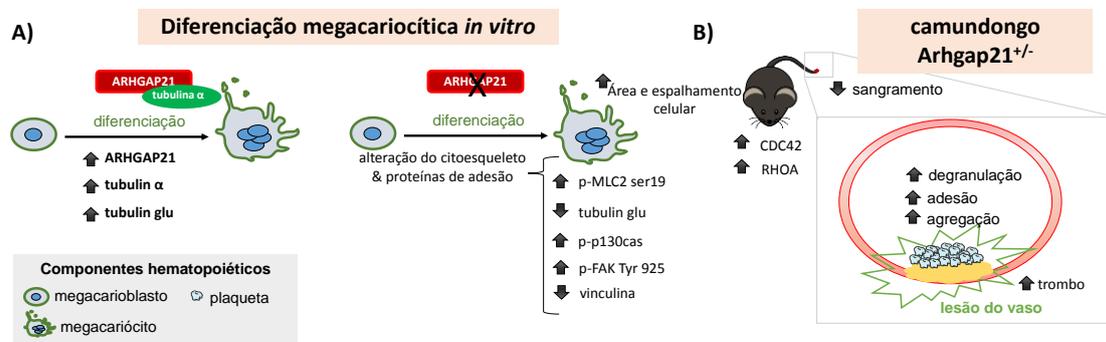
Além disso, o silenciamento da ARHGAP21 em células HEL alterou a atividade de FAK, p130Cas e zyxin no segundo dia de diferenciação megacariocítica. FAK é requerida para a migração celular e adesão e está envolvida na maturação de megacariócitos e produção de plaquetas (119). Demonstramos anteriormente em células de glioblastoma que o silenciamento da ARHGAP21 aumentou as atividades de CDC42 e FAK e induziu a migração celular (88). Assim, o silenciamento de ARHGAP21 pode ativar FAK, MCL e p130CAS, controlando a maquinaria contrátil de megacariócitos e plaquetas, por meio da ligação de monômeros de actina à actinina  $\alpha$  e zyxin (120).

Alterações morfológicas induzidas pelo silenciamento da ARHGAP21, como aumento da área celular, polaridade e formação de protruções citoplasmáticas, podem estar relacionadas à instabilidade dos microtúbulos. Paralelamente a esses achados, os camundongos *Arhgap21<sup>+/-</sup>* exibiram um aumento no volume plaquetário e uma ligeira diminuição no número de plaquetas (120), corroborando a concepção de que o tamanho e a forma das células são determinados por alterações citoesqueléticas (79,116). O silenciamento da ARHGAP21 não afetou a ploidia e os marcadores de diferenciação megacariocítica das células HEL, ou o número de megacariócitos murinos e UFC-Mk. Nossos resultados, tomados juntamente com os estudos acima mencionados, sugerem que ARHGAP21 coordena a organização do citoesqueleto durante a maturação de megacariócitos sem interferir na aquisição de marcadores de diferenciação de superfície celular.

Os camundongos *Arhgap21<sup>+/-</sup>* apresentaram redução no tempo de sangramento e formação acelerada de trombos, sugerindo um defeito plaquetário funcional associado à maior capacidade de agregação. Confirmando esses achados, observamos aumento da agregação plaquetária induzida pela trombina. Durante a ativação plaquetária, ocorre uma alteração conformacional associada a rearranjos do citoesqueleto, com perda da forma discóide e aparecimento de morfologia irregular com múltiplas projeções citoplasmáticas (116). O grau de agregação em resposta aos agonistas depende fortemente da secreção de mediadores de grânulos, e CDC42 demonstrou ser crítico na exocitose em muitas células (121). Além disso, a depleção de RHOA resultou em proteção em diferentes modelos de trombose arterial (122).

Assim, o aumento da agregação plaquetária e a aceleração da formação de trombos neste trabalho observados podem estar relacionados ao aumento das atividades

de CDC42 e RHOA. Nossas principais descobertas sobre o papel de ARHGAP21 durante a diferenciação de megacariócitos e a função plaquetária estão resumidas no esquema da Figura 35.



**Figura 35. Principais achados sobre o papel da ARHGAP21 na diferenciação megacariocítica e funções plaquetárias.** (A) ARHGAP21 interage com tubulina  $\alpha$  e sua expressão aumenta durante a diferenciação megacariocítica das células HEL, junto com a tubulina acetilada e a tubulina glu. O silenciamento da ARHGAP21 em células HEL resulta em alterações da morfologia como aumento da área celular e maior espalhamento no frasco de cultura com aumento de protrusões celulares durante a diferenciação megacariocítica. O aumento da expressão de p-MLC2-Ser 19, p-p130cas, p-FAK Tyr 925 e a diminuição da expressão de tubulina glu e vinculina também foram detectados em células HEL silenciadas para ARHGAP21. (B) Células da medula óssea de camundongo *Arhgap21*<sup>+/-</sup> apresentaram aumento das atividades CDC42 e RHOA antes da indução da diferenciação megacariocítica. Camundongo *Arhgap21*<sup>+/-</sup> apresentou diminuição do tempo de sangramento na cauda, acelerada formação de trombo após lesão arterial da carótida, aumento da agregação plaquetária induzida por trombina e expressão de p-selectina e aumento do tamanho dos grânulos  $\alpha$  das plaquetas.

Em conclusão, descrevemos que a expressão da ARHGAP21 aumenta durante a diferenciação megacariocítica, e que seu silenciamento leva à alteração no equilíbrio da dinâmica dos microtúbulos, que é necessária para a biogênese plaquetária adequada, possivelmente através de sua atividade RhoGAP sobre CDC42 e RHOA e interação com tubulina alfa. No modelo de camundongo, a função plaquetária também é afetada pela redução da *Arhgap21*, tornando menor o tempo de sangramento na cauda e acelerando a formação de trombo, os quais estão relacionados ao aumento do tamanho e agregação das plaquetas. Todos esses resultados tornam ARHGAP21 como uma proteína envolvida no processo hemostático.

## 6. CONCLUSÃO

O conjunto dos resultados apresentados neste trabalho permite as seguintes conclusões:

Em modelo de células HEL submetidas à diferenciação megacariocítica:

1. A expressão da ARHGAP21 aumenta durante a diferenciação megacariocítica e é acompanhada pelo aumento da expressão de proteínas do citoesqueleto, como tubulina acetilada, tubulina glu, tubulina alfa e estatmina.
2. ARHGAP21 e tubulina  $\alpha$  interagem e se colocalizam nas protrusões citoplasmáticas. Maior expressão da ARHGAP21 foi detectada em extratos proteicos contendo tubulina polimerizada em comparação a extratos proteicos contendo tubulina solúvel.
3. Silenciamento da ARHGAP21 aumenta a atividade de CDC42 e altera a expressão e atividade de diversas proteínas: reduz a expressão da tubulina glu e vinculina, reduz a atividade da p-zyxin e aumenta a atividade da p-MLC2, p-p130CAS e p-FAK tyr 925.
4. O silenciamento da ARHGAP21 altera a morfologia celular promovendo o aumento da área celular, polaridade e protrusões durante a diferenciação megacariocítica.
5. Silenciamento da ARHGAP21 não altera a aquisição de marcadores de diferenciação de superfície celular para CD61<sup>+</sup> CD41<sup>+</sup> e CD41<sup>+</sup> CD49b<sup>+</sup> ou ploidia.

Em modelo de camundongos heterozigotos nocautes para *Arhgap21* (*Arhgap21*<sup>+/-</sup>):

1. Aumento da expressão da *Arhgap21* em células primárias de camundongos ARHGAP21<sup>+/-</sup> durante a diferenciação megacariocítica.
2. Células da medula óssea de camundongos ARHGAP21<sup>+/-</sup> apresentam aumento da expressão e atividade de RHOA e CDC42.
3. Células da medula óssea de camundongos *Arhgap21*<sup>+/-</sup> exibem mais espalhamento no frasco de cultura com aumento de protrusões celulares durante a diferenciação megacariocítica.

4. Células Arhgap21<sup>+/-</sup> da medula óssea e células Arhgap21<sup>+/-</sup> para UFC-Mk não apresentam diferença significativa nas populações CD61<sup>+</sup> CD41<sup>+</sup> e CD41<sup>+</sup> CD42<sup>+</sup>; e Arhgap21<sup>+/-</sup> não altera a quantidade de megacariócitos na MO.
5. Camundongos Arhgap21<sup>+/-</sup> exibem resposta hemostática acelerada com menor tempo de sangramento na cauda e acelerada formação de trombo após lesão arterial da carótida induzida por FeCl<sub>3</sub>.
6. Plaquetas de camundongos Arhgap21<sup>+/-</sup> apresentam aumento na agregação *in vitro* induzida pela trombina e aumento do tamanho dos grânulos  $\alpha$ .

## 7. REFERÊNCIAS

1. Couldwell G, Machlus KR. Modulation of megakaryopoiesis and platelet production during inflammation [Internet]. Vol. 179, *Thrombosis Research*. Elsevier Ltd; 2019 [cited 2021 Jun 27]. p. 114–20. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31128560/>
2. Malara A, Currao M, Gruppi C, Celesti G, Viarengo G, Buracchi C, et al. Megakaryocytes contribute to the bone marrow-matrix environment by expressing fibronectin, type IV collagen, and laminin. *Stem Cells* [Internet]. 2014 [cited 2021 Jun 27];32(4):926–37. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24357118/>
3. Kunisaki Y, Bruns I, Scheiermann C, Ahmed J, Pinho S, Zhang D, et al. Arteriolar niches maintain haematopoietic stem cell quiescence. *Nature* [Internet]. 2013 [cited 2021 Jun 27];502(7473):637–43. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24107994/>
4. Sugiyama T, Kohara H, Noda M, Nagasawa T. Maintenance of the Hematopoietic Stem Cell Pool by CXCL12-CXCR4 Chemokine Signaling in Bone Marrow Stromal Cell Niches. *Immunity* [Internet]. 2006 Dec [cited 2021 Jun 27];25(6):977–88. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17174120/>
5. Congdon KL, Reya T. Divide and conquer: how asymmetric division shapes cell fate in the hematopoietic system. *Current opinion in immunology* [Internet]. 2008 Jun [cited 2021 Dec 2];20(3):302–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18554882/>
6. Seita J, Weissman IL. Hematopoietic stem cell: Self-renewal versus differentiation [Internet]. Vol. 2, *Wiley Interdisciplinary Reviews: Systems Biology and Medicine*. Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med; 2010 [cited 2021 Jun 27]. p. 640–53. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20890962/>
7. Etulain J. Platelets in wound healing and regenerative medicine [Internet]. Vol. 29, *Platelets*. Taylor and Francis Ltd; 2018 [cited 2021 Jun 27]. p. 556–68. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29442539/>
8. Xu XR, Yousef GM, Ni H. Cancer and platelet crosstalk: Opportunities and challenges of aspirin and other antiplatelet agents [Internet]. Vol. 131, *Blood*. American Society of Hematology; 2018 [cited 2021 Jun 27]. p. 1777–89. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29519806/>
9. Holinstat M. Normal platelet function [Internet]. Vol. 36, *Cancer and Metastasis Reviews*. Springer New York LLC; 2017 [cited 2021 Jun 27]. p. 195–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28667366/>
10. Jurk K, Kehrel BE. Platelets: Physiology and biochemistry. In: *Seminars in Thrombosis and Hemostasis* [Internet]. *Semin Thromb Hemost*; 2005 [cited 2021 Jun 27]. p. 381–92. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16149014/>
11. Ruggeri ZM, Mendolicchio GL. Adhesion mechanisms in platelet function [Internet]. Vol. 100, *Circulation Research*. *Circ Res*; 2007 [cited 2021 Jun 27]. p. 1673–85. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17585075/>
12. Finkenstaedt-Quinn SA, Ge S, Haynes CL. Cytoskeleton dynamics in drug-treated platelets. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* [Internet]. 2015 Mar 22 [cited 2021 Jun 27];407(10):2803–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25701419/>
13. Yang SA, Carpenter CL, Abrams CS. Rho and Rho-kinase mediate thrombin-induced phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase trafficking in platelets. *Journal of Biological Chemistry* [Internet]. 2004 Oct 1 [cited 2021 Jun 27];279(40):42331–6. Available from:

- <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15277528/>
14. Aslan JE, Baker SM, Loren CP, Haley KM, Itakura A, Pang J, et al. The PAK system links Rho GTPase signaling to thrombin-mediated platelet activation. *American Journal of Physiology - Cell Physiology* [Internet]. 2013 Sep 1 [cited 2021 Jun 27];305(5). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23784547/>
  15. McNicol A, Israels SJ. Platelet dense granules: Structure, function and implications for haemostasis [Internet]. Vol. 95, *Thrombosis Research*. Thromb Res; 1999 [cited 2021 Jun 27]. p. 1–18. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10403682/>
  16. Maynard DM, Heijnen HFG, Horne MK, White JG, Gahl WA. Proteomic analysis of platelet  $\alpha$ -granules using mass spectrometry. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* [Internet]. 2007 Sep [cited 2021 Jun 27];5(9):1945–55. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17723134/>
  17. Broos K, Feys HB, De Meyer SF, Vanhoorelbeke K, Deckmyn H. Platelets at work in primary hemostasis. *Blood Reviews* [Internet]. 2011 Jul [cited 2021 Jun 27];25(4):155–67. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21496978/>
  18. Saluk-Bijak J, Dziedzic A, Bijak M. Pro-Thrombotic Activity of Blood Platelets in Multiple Sclerosis. *Cells* [Internet]. 2019 Feb 1 [cited 2021 Jun 27];8(2):110. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30717273/>
  19. Crane GM, Jeffery E, Morrison SJ. Adult haematopoietic stem cell niches [Internet]. Vol. 17, *Nature Reviews Immunology*. Nature Publishing Group; 2017 [cited 2021 Jun 27]. p. 573–90. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28604734/>
  20. Kaushansky K. Thrombopoiesis [Internet]. Vol. 52, *Seminars in Hematology*. W.B. Saunders; 2015 [cited 2021 Jun 27]. p. 4–11. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25578413/>
  21. Hitchcock IS, Fox NE, Prévost N, Sear K, Shattil SJ, Kaushansky K. Roles of focal adhesion kinase (FAK) in megakaryopoiesis and platelet function: Studies using a megakaryocyte lineage-specific FAK knockout. *Blood* [Internet]. 2008 Jan 15 [cited 2021 Jun 27];111(2):596–604. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17925492/>
  22. Kostyak JC, Naik MU, Naik UP. Calcium- and integrin-binding protein 1 regulates megakaryocyte ploidy, adhesion, and migration. *Blood* [Internet]. 2012 Jan 19 [cited 2021 Jun 27];119(3):838–46. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22128142/>
  23. Larson MK, Watson SP. Regulation of proplatelet formation and platelet release by integrin  $\alpha$ IIb $\beta$ 3. *Blood* [Internet]. 2006 Sep 1 [cited 2021 Jun 27];108(5):1509–14. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16670270/>
  24. Machlus KR, Italiano JE. The incredible journey: From megakaryocyte development to platelet formation [Internet]. Vol. 201, *Journal of Cell Biology*. J Cell Biol; 2013 [cited 2021 Jun 27]. p. 785–96. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23751492/>
  25. Nakao K, Angrist AA. Membrane surface specialization of blood platelet and megakaryocyte [Internet]. Vol. 217, *Nature*. Nature; 1968 [cited 2021 Jun 27]. p. 960–1. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/4230624/>
  26. Junt T, Schulze H, Chen Z, Massberg S, Goerge T, Krueger A, et al. Dynamic visualization of thrombopoiesis within bone marrow. *Science* [Internet]. 2007 Sep 21 [cited 2021 Jun 27];317(5845):1767–70. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17885137/>

27. French DL. Megakaryocytes put a foot through the door. [Internet]. Vol. 121, *Blood*. Blood; 2013 [cited 2021 Jun 27]. p. 2379–80. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23538231/>
28. Richardson JL, Shivdasani RA, Boers C, Hartwig JH, Italiano JE. Mechanisms of organelle transport and capture along proplatelets during platelet production. *Blood* [Internet]. 2005 Dec 15 [cited 2021 Jun 27];106(13):4066–75. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16118320/>
29. Eckly A, Heijnen H, Pertuy F, Geerts W, Proamer F, Rinckel JY, et al. Biogenesis of the demarcation membrane system (DMS) in megakaryocytes. *Blood* [Internet]. 2014 Feb 6 [cited 2021 Jun 27];123(6):921–30. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24152908/>
30. Hartwig JH, Italiano JE. Cytoskeletal mechanisms for platelet production. *Blood Cells, Molecules, and Diseases* [Internet]. 2006 Mar [cited 2021 Jun 27];36(2):99–103. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16464622/>
31. Patel SR, Hartwig JH, Italiano JE. The biogenesis of platelets from megakaryocyte proplatelets [Internet]. Vol. 115, *Journal of Clinical Investigation*. *J Clin Invest*; 2005 [cited 2021 Jun 27]. p. 3348–54. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16322779/>
32. Patel-Hett S, Richardson JL, Schulze H, Drabek K, Isaac NA, Hoffmeister K, et al. Visualization of microtubule growth in living platelets reveals a dynamic marginal band with multiple microtubules. *Blood* [Internet]. 2008 May 1 [cited 2021 Jun 27];111(9):4605–16. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18230754/>
33. Antkowiak A, Viaud J, Severin S, Zanon M, Ceccato L, Chicanne G, et al. Cdc42-dependent F-actin dynamics drive structuration of the demarcation membrane system in megakaryocytes. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* [Internet]. 2016 Jun 1 [cited 2021 Jun 27];14(6):1268–84. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26991240/>
34. Zuidschewoude M, Green HLH, Thomas SG. Formin proteins in megakaryocytes and platelets: regulation of actin and microtubule dynamics [Internet]. Vol. 30, *Platelets*. Taylor and Francis Ltd; 2019 [cited 2021 Jun 27]. p. 23–30. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29913076/>
35. Cuenca-Zamora EJ, Ferrer-Marín F, Rivera J, Teruel-Montoya R. Tubulin in Platelets: When the Shape Matters [Internet]. Vol. 20, *International Journal of Molecular Sciences*. MDPI AG; 2019 [cited 2021 Jun 27]. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31315202/>
36. Ghalloussi D, Dhenge A, Bergmeier W. New insights into cytoskeletal remodeling during platelet production [Internet]. Vol. 17, *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. Blackwell Publishing Ltd; 2019 [cited 2021 May 10]. p. 1430–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31220402/>
37. Pleines I, Cherpokova D, Bender M. Rho GTPases and their downstream effectors in megakaryocyte biology [Internet]. Vol. 30, *Platelets*. Taylor and Francis Ltd; 2019 [cited 2021 Jun 27]. p. 9–16. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29913074/>
38. Eshun-Wilson L, Zhang R, Portran D, Nachury M V., Toso DB, Löhr T, et al. Effects of  $\alpha$ -tubulin acetylation on microtubule structure and stability. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* [Internet]. 2019 [cited 2021 Dec 2];116(21):10366–71. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31072936/>
39. Stritt S, Nurden P, Turro E, Greene D, Jansen SB, Westbury SK, et al. A gain-of-

- function variant in DIAPH1 causes dominant macrothrombocytopenia and hearing loss. *Blood* [Internet]. 2016 Jun 9 [cited 2021 May 10];127(23):2903–14. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26912466/>
40. Gundersen GG, Kalnoski MH, Bulinski JC. Distinct populations of microtubules: Tyrosinated and nontyrosinated alpha tubulin are distributed differently in vivo. *Cell* [Internet]. 1984 [cited 2021 May 10];38(3):779–89. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6386177/>
  41. Strassel C, Magiera MM, Dupuis A, Batzenschlager M, Hovasse A, Pleines I, et al. An essential role for  $\alpha$ 4A-tubulin in platelet biogenesis. *Life Science Alliance* [Internet]. 2019 Feb 13 [cited 2021 Jun 27];2(1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30760556/>
  42. Moutin MJ, Bosc C, Peris L, Andrieux A. Tubulin post-translational modifications control neuronal development and functions. *Developmental neurobiology* [Internet]. 2021 Apr 1 [cited 2021 Dec 2];81(3):253–72. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33325152/>
  43. Akhmanova A, Maiato H. Closing the tubulin detyrosination cycle. *Science (New York, NY)* [Internet]. 2017 Dec 15 [cited 2021 Dec 2];358(6369):1381–2. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29242330/>
  44. Yoshie M, Ishida A, Ohashi H, Nakachi N, Azumi M, Tamura K. Stathmin dynamics modulate the activity of eribulin in breast cancer cells. *Pharmacology research & perspectives* [Internet]. 2021 Aug 1 [cited 2021 Dec 2];9(4). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34176226/>
  45. Rubin CI, French DL, Atweh GF. Stathmin expression and megakaryocyte differentiation: a potential role in polyploidy. *Experimental hematology* [Internet]. 2003 May 1 [cited 2021 Dec 2];31(5):389–97. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12763137/>
  46. Schwer HD, Lecine P, Tiwari S, Italiano JE, Hartwig JH, Shivdasani RA. A lineage-restricted and divergent  $\beta$ -tubulin isoform is essential for the biogenesis, structure and function of blood platelets. *Current Biology* [Internet]. 2001 Apr 17 [cited 2021 Jun 27];11(8):579–86. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11369202/>
  47. Revach OY, Grosheva I, Geiger B. Biomechanical regulation of focal adhesion and invadopodia formation. *Journal of cell science* [Internet]. 2020 Oct 1 [cited 2021 Dec 2];133(20). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33093229/>
  48. Bance B, Seetharaman S, Leduc C, Boeda B, Etienne-Manneville S. Microtubule acetylation but not detyrosination promotes focal adhesion dynamics and astrocyte migration. *Journal of cell science* [Internet]. 2019 Apr 1 [cited 2021 Dec 2];132(7). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30858195/>
  49. Seetharaman S, Etienne-Manneville S. Cytoskeletal Crosstalk in Cell Migration. *Trends in cell biology* [Internet]. 2020 Sep 1 [cited 2021 Dec 2];30(9):720–35. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32674938/>
  50. Paul DS, Casari C, Wu C, Piatt R, Pasala S, Campbell RA, et al. Deletion of the Arp2/3 complex in megakaryocytes leads to microthrombocytopenia in mice. *Blood Advances* [Internet]. 2017 Aug 8 [cited 2021 Jun 27];1(18):1398–408. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29104956/>
  51. Mazzi S, Lordier L, Debili N, Raslova H, Vainchenker W. Megakaryocyte and polyploidization [Internet]. Vol. 57, *Experimental Hematology*. Elsevier Inc.; 2018 [cited 2021 Jun 27]. p. 1–13. Available from:

- <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29111429/>
52. Ananthkrishnan R, Ehrlicher A. The forces behind cell movement. *International journal of biological sciences* [Internet]. 2007 Jun 1 [cited 2021 Dec 2];3(5):303–17. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17589565/>
  53. Maziveyi M, Alahari SK. Cell matrix adhesions in cancer: The proteins that form the glue. *Oncotarget* [Internet]. 2017 [cited 2021 Dec 2];8(29):48471–87. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28476046/>
  54. Sun Z, Guo SS, Fässler R. Integrin-mediated mechanotransduction. *The Journal of cell biology* [Internet]. 2016 [cited 2021 Dec 2];215(4):445–56. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27872252/>
  55. Jansen KA, Atherton P, Ballestrem C. Mechanotransduction at the cell-matrix interface. *Seminars in cell & developmental biology* [Internet]. 2017 Nov 1 [cited 2021 Dec 2];71:75–83. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28754442/>
  56. Guidetti GF, Torti M, Canobbio I. Focal Adhesion Kinases in Platelet Function and Thrombosis. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* [Internet]. 2019 May 1 [cited 2021 Dec 2];39(5):857–68. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30894012/>
  57. Van Den Dries K, Meddens MBM, De Keijzer S, Shekhar S, Subramaniam V, Figdor CG, et al. Interplay between myosin IIA-mediated contractility and actin network integrity orchestrates podosome composition and oscillations. *Nature Communications* [Internet]. 2013 [cited 2021 Jun 27];4. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23361003/>
  58. van den Dries K, Nahidiazar L, Slotman JA, Meddens MBM, Pandzic E, Joosten B, et al. Modular actin nano-architecture enables podosome protrusion and mechanosensing. *Nature Communications* [Internet]. 2019 Dec 1 [cited 2021 Jun 27];10(1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31729386/>
  59. Horton ER, Humphries JD, James J, Jones MC, Askari JA, Humphries MJ. The integrin adhesion network at a glance. *Journal of cell science* [Internet]. 2016 [cited 2021 Dec 2];129(22):4159–63. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27799358/>
  60. Schneider IC, Hays CK, Waterman CM. Epidermal growth factor-induced contraction regulates paxillin phosphorylation to temporally separate traction generation from de-adhesion. *Molecular biology of the cell* [Internet]. 2009 Jul 1 [cited 2021 Dec 2];20(13):3155–67. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19403690/>
  61. Yoshigi M, Hoffman LM, Jensen CC, Yost HJ, Beckerle MC. Mechanical force mobilizes zyxin from focal adhesions to actin filaments and regulates cytoskeletal reinforcement. *The Journal of cell biology* [Internet]. 2005 Oct 24 [cited 2021 Dec 2];171(2):209–15. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16247023/>
  62. Katoh K. FAK-Dependent Cell Motility and Cell Elongation. *Cells* [Internet]. 2020 Jan 12 [cited 2021 Dec 2];9(1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31940873/>
  63. Wang HB, Dembo M, Hanks SK, Wang YL. Focal adhesion kinase is involved in mechanosensing during fibroblast migration. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* [Internet]. 2001 Sep 25 [cited 2021 Dec 2];98(20):11295–300. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11572981/>
  64. Polte TR, Hanks SK. Interaction between focal adhesion kinase and Crk-associated tyrosine kinase substrate p130Cas. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* [Internet]. 1995 Nov 7 [cited 2021 Dec 2];92(23):10678–82. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7479864/>

65. Tapial Martínez P, López Navajas P, Lietha D. FAK Structure and Regulation by Membrane Interactions and Force in Focal Adhesions. *Biomolecules* [Internet]. 2020 Jan 24 [cited 2021 Dec 2];10(2). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31991559/>
66. Liu Y, Loijens JC, Martin KH, Karginov A V., Parsons JT. The association of ASAP1, an ADP ribosylation factor-GTPase activating protein, with focal adhesion kinase contributes to the process of focal adhesion assembly. *Molecular biology of the cell* [Internet]. 2002 [cited 2021 Dec 2];13(6):2147–56. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12058076/>
67. Tachibana K, Sato T, D'Avirro N, Morimoto C. Direct association of pp125FAK with paxillin, the focal adhesion-targeting mechanism of pp125FAK. *The Journal of experimental medicine* [Internet]. 1995 Oct 1 [cited 2021 Dec 2];182(4):1089–100. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7561682/>
68. Lawson C, Lim ST, Uryu S, Chen XL, Calderwood DA, Schlaepfer DD. FAK promotes recruitment of talin to nascent adhesions to control cell motility. *The Journal of cell biology* [Internet]. 2012 Jan [cited 2021 Dec 2];196(2):223–32. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22270917/>
69. Izaguirre G, Aguirre L, Hu YP, Lee HY, Schlaepfer DD, Aneskievich BJ, et al. The Cytoskeletal/Non-muscle Isoform of  $\alpha$ -Actinin Is Phosphorylated on Its Actin-binding Domain by the Focal Adhesion Kinase. *Journal of Biological Chemistry* [Internet]. 2001 Aug 3 [cited 2021 Jun 27];276(31):28676–85. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11369769/>
70. Hodge RG, Ridley AJ. Regulating Rho GTPases and their regulators. *Nature reviews Molecular cell biology* [Internet]. 2016 Jul 21 [cited 2021 Dec 2];17(8):496–510. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27301673/>
71. Haga RB, Ridley AJ. Rho GTPases: Regulation and roles in cancer cell biology. *Small GTPases* [Internet]. 2016 Oct 1 [cited 2021 Dec 2];7(4):207–21. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27628050/>
72. Cherfils J, Zeghouf M. Regulation of small GTPases by GEFs, GAPs, and GDIs. *Physiological reviews* [Internet]. 2013 Jan 1 [cited 2021 Dec 2];93(1):269–309. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23303910/>
73. Pleines I, Dütting S, Cherpokova D, Eckly A, Meyer I, Morowski M, et al. Defective tubulin organization and proplatelet formation in murine megakaryocytes lacking Rac1 and Cdc42. *Blood* [Internet]. 2013 [cited 2021 May 10];122(18):3178–87. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23861250/>
74. Hall A. Rho GTPases and the control of cell behaviour. In: *Biochemical Society Transactions* [Internet]. *Biochem Soc Trans*; 2005 [cited 2021 Jun 27]. p. 891–5. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16246005/>
75. Vainchenker W, Arkoun B, Basso-Valentina F, Lordier L, Debili N, Raslova H. Role of Rho-GTPases in megakaryopoiesis. *Small GTPases* [Internet]. 2021 [cited 2021 Dec 2];12(5–6):399–415. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33570449/>
76. Kimura K, Ito M, Amano M, Chihara K, Fukata Y, Nakafuku M, et al. Regulation of myosin phosphatase by Rho and Rho-associated kinase (Rho-kinase). *Science* [Internet]. 1996 Jul 12 [cited 2021 Jun 27];273(5272):245–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8662509/>
77. Takesono A, Heasman SJ, Wojciak-Stothard B, Garg R, Ridley AJ. Microtubules regulate migratory polarity through Rho/ROCK signaling in T cells. *PLoS ONE*

- [Internet]. 2010 Jan 19 [cited 2021 Jun 27];5(1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20098744/>
78. Sumi T, Matsumoto K, Takai Y, Nakamura T. Cofilin phosphorylation and actin cytoskeletal dynamics regulated by Rho- and Cdc42-activated LIM-kinase 2. *Journal of Cell Biology* [Internet]. 1999 Dec 27 [cited 2021 Jun 27];147(7):1519–32. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10613909/>
  79. Pleines I, Eckly A, Elvers M, Hagedorn I, Eliautou S, Bender M, et al. Multiple alterations of platelet functions dominated by increased secretion in mice lacking Cdc42 in platelets. *Blood* [Internet]. 2010 Apr 22 [cited 2021 May 10];115(16):3364–73. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20139097/>
  80. Dütting S, Gaits-Iacovoni F, Stegner D, Popp M, Antkowiak A, Van Eeuwijk JMM, et al. A Cdc42/RhoA regulatory circuit downstream of glycoprotein Ib guides transendothelial platelet biogenesis. *Nature Communications* [Internet]. 2017 Jun 15 [cited 2021 May 10];8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28643773/>
  81. Pleines I, Cherpokova D, Bender M. Rho GTPases and their downstream effectors in megakaryocyte biology [Internet]. Vol. 30, Platelets. Taylor and Francis Ltd; 2019 [cited 2021 May 10]. p. 9–16. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29913074/>
  82. McCarty OJT, Larson MK, Auger JM, Kalia N, Atkinson BT, Pearce AC, et al. Rac1 is essential for platelet lamellipodia formation and aggregate stability under flow. *Journal of Biological Chemistry* [Internet]. 2005 Nov 25 [cited 2021 Jun 27];280(47):39474–84. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16195235/>
  83. Heib T, Hermanns HM, Manukjan G, Englert M, Kusch C, Becker IC, et al. RhoA/Cdc42 signaling drives cytoplasmic maturation but not endomitosis in megakaryocytes. *Cell reports* [Internet]. 2021 May 11 [cited 2021 Dec 2];35(6). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33979620/>
  84. Sanchez Bassères D, Vedelago Tizzei E, Duarte AAS, Ferreira Costa F, Olalla Saad ST. ARHGAP10, a novel human gene coding for a potentially cytoskeletal Rho-GTPase activating protein. *Biochemical and Biophysical Research Communications* [Internet]. 2002 [cited 2021 Jun 27];294(3):579–85. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12056806/>
  85. Wang DS, Shaw R, Winkelmann JC, Shaw G. Binding of PH domains of beta-adrenergic receptor kinase and beta-spectrin to WD40/beta-transducin repeat containing regions of the beta-subunit of trimeric G-proteins. *Biochemical and biophysical research communications* [Internet]. 1994 Aug 30 [cited 2021 Dec 2];203(1):29–35. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8074669/>
  86. Ranganathan R, Ross EM. PDZ domain proteins: scaffolds for signaling complexes. *Current biology : CB* [Internet]. 1997 Dec 1 [cited 2021 Dec 2];7(12). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9382826/>
  87. Lazarini M, Traina F, Machado-Neto JA, Barcellos KSA, Moreira YB, Brandão MM, et al. ARHGAP21 is a RhoGAP for RhoA and RhoC with a role in proliferation and migration of prostate adenocarcinoma cells. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease* [Internet]. 2013 Feb [cited 2021 Jun 27];1832(2):365–74. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23200924/>
  88. Bigarella CL, Borges L, Costa FF, Saad STO. ARHGAP21 modulates FAK activity and impairs glioblastoma cell migration. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research* [Internet]. 2009 May [cited 2021 May 10];1793(5):806–16. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19268501/>

89. Janke C, Bulinski JC. Post-translational regulation of the microtubule cytoskeleton: Mechanisms and functions [Internet]. Vol. 12, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. *Nat Rev Mol Cell Biol*; 2011 [cited 2021 May 10]. p. 773–86. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22086369/>
90. Zhang L, Luga V, Armitage SK, Musiol M, Won A, Yip CM, et al. A lateral signalling pathway coordinates shape volatility during cell migration. *Nature Communications* [Internet]. 2016 May 26 [cited 2021 Jun 27];7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27226243/>
91. Barcellos KSA, Bigarella CL, Wagner M V., Vieira KP, Lazarini M, Langford PR, et al. ARHGAP21 protein, a new partner of  $\alpha$ -tubulin involved in cell-cell adhesion formation and essential for epithelial-mesenchymal transition. *Journal of Biological Chemistry* [Internet]. 2013 Jan 25 [cited 2021 May 10];288(4):2179–89. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23235160/>
92. Xavier-Ferrucio J, Ricon L, Vieira K, Longhini AL, Lazarini M, Bigarella CL, et al. Hematopoietic defects in response to reduced Arhgap21. *Stem Cell Research* [Internet]. 2018 Jan 1 [cited 2021 May 10];26:17–27. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29212046/>
93. Anthony DF, Sin YY, Vadrevu S, Advant N, Day JP, Byrne AM, et al.  $\beta$ -Arrestin 1 Inhibits the GTPase-Activating Protein Function of ARHGAP21, Promoting Activation of RhoA following Angiotensin II Type 1A Receptor Stimulation. *Molecular and Cellular Biology* [Internet]. 2011 Mar [cited 2021 Jun 27];31(5):1066–75. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21173159/>
94. Hehnly H, Xu W, Chen JL, Stamnes M. Cdc42 regulates microtubule-dependent golgi positioning. *Traffic* [Internet]. 2010 Aug [cited 2021 Jun 27];11(8):1067–78. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20525016/>
95. Dubois T, Paléotti O, Mironov AA, Fraasier V, Stradal TEB, De Matteis MA, et al. Golgi-localized GAP for Cdc42 functions downstream of ARF1 to control Arp2/3 complex and F-actin dynamics. *Nature Cell Biology* [Internet]. 2005 Apr [cited 2021 Jun 27];7(4):353–64. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15793564/>
96. Zhang L, Wrana JL. Regulation of Rho GTPases from the lateral sides of migrating cells [Internet]. Vol. 9, *Small GTPases*. Taylor and Francis Inc.; 2018 [cited 2021 Jun 27]. p. 345–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27657886/>
97. Hehnly H, Longhini KM, Chen JL, Stamnes M. Retrograde Shiga toxin trafficking is regulated by ARHGAP21 and Cdc42. *Molecular Biology of the Cell* [Internet]. 2009 Oct 15 [cited 2021 Jun 27];20(20):4303–12. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19692570/>
98. Ferreira SM, Santos GJ, Rezende LF, Gonçalves LM, Santos-Silva JC, Bigarella CL, et al. ARHGAP21 prevents abnormal insulin release through actin rearrangement in pancreatic islets from neonatal mice. *Life Sciences* [Internet]. 2015 Apr 15 [cited 2021 Jun 27];127:53–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25744409/>
99. Zangerolamo L, Soares GM, Vettorazzi JF, Do Amaral ME, Carneiro EM, Olalla-Saad ST, et al. ARHGAP21 deficiency impairs hepatic lipid metabolism and improves insulin signaling in lean and obese mice. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology* [Internet]. 2019 [cited 2021 Jun 27];97(11):1018–27. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31247150/>
100. Ng DCH, Bao HL, Cheh PL, Huang G, Zhang T, Poli V, et al. Stat3 regulates microtubules by antagonizing the depolymerization activity of stathmin. *Journal of Cell Biology* [Internet]. 2006 Jan 16 [cited 2021 May 10];172(2):245–57. Available from:

- <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16401721/>
101. Zhang C, Liu J, Liang Y, Wu R, Zhao Y, Hong X, et al. Tumour-associated mutant p53 drives the Warburg effect. *Nature Communications* [Internet]. 2013 Dec 17 [cited 2021 May 10];4. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24343302/>
  102. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods* [Internet]. 2001 [cited 2021 May 10];25(4):402–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11846609/>
  103. Naime ACA, Bonfitto PHL, Solon C, Lopes-Pires ME, Anê GF, Antunes E, et al. Tumor necrosis factor alpha has a crucial role in increased reactive oxygen species production in platelets of mice injected with lipopolysaccharide. *Platelets* [Internet]. 2019 Nov 17 [cited 2021 May 10];30(8):1047–52. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31076004/>
  104. Lescano CH, Leonardi G, Torres PHP, Amaral TN, de Freitas Filho LH, Antunes E, et al. The sodium-glucose cotransporter-2 (SGLT2) inhibitors synergize with nitric oxide and prostacyclin to reduce human platelet activation. *Biochemical Pharmacology* [Internet]. 2020 Dec 1 [cited 2021 May 10];182. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33039417/>
  105. White JG. Electron opaque structures in human platelets: Which are or are not dense bodies? *Platelets* [Internet]. 2008 Sep [cited 2021 May 10];19(6):455–66. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18925514/>
  106. Chen Y, Yuan Y, Li W. Sorting machineries: How platelet-dense granules differ from  $\alpha$ -granules [Internet]. Vol. 38, *Bioscience Reports*. Portland Press Ltd; 2018 [cited 2021 May 10]. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30104399/>
  107. Blair P, Flaumenhaft R. Platelet  $\alpha$ -granules: Basic biology and clinical correlates. *Blood Reviews* [Internet]. 2009 Jul [cited 2021 May 10];23(4):177–89. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19450911/>
  108. CARNEIRO GD, SIELSKI MS, VIEIRA CP, COSTA FTM, WERNECK CC, VICENTE CP. Administration of endothelial progenitor cells accelerates the resolution of arterial thrombus in mice. *Cytotherapy* [Internet]. 2019 Apr 1 [cited 2021 May 10];21(4):444–59. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30904331/>
  109. Stouffer GA, Smyth SS. Effects of Thrombin on Interactions between  $\beta$ 3-Integrins and Extracellular Matrix in Platelets and Vascular Cells [Internet]. Vol. 23, *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*; 2003 [cited 2021 May 10]. p. 1971–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12947018/>
  110. EC S, AM T, RC C, L W, Y G, KL H, et al. Induction of megakaryocyte differentiation drives nuclear accumulation and transcriptional function of MKL1 via actin polymerization and RhoA activation. *Blood* [Internet]. 2013 Feb 14 [cited 2021 Aug 8];121(7):1094–101. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23243284/>
  111. Fuhrken PG, Chen C, Miller WM, Papoutsakis ET. Comparative, genome-scale transcriptional analysis of CHR2-288-11 and primary human megakaryocytic cell cultures provides novel insights into lineage-specific differentiation. *Experimental Hematology* [Internet]. 2007 [cited 2021 May 10];35(3). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17309828/>
  112. Strassel C, Magiera MM, Dupuis A, Batzenschlager M, Hovasse A, Pleines I, et al. An essential role for  $\alpha$ 4A-tubulin in platelet biogenesis. *Life Science Alliance* [Internet]. 2019 Feb 13 [cited 2021 May 10];2(1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30760556/>

113. van Dijk J, Bompard G, Cau J, Kunishima S, Rabeharivelo G, Mateos-Langerak J, et al. Microtubule polyglutamylation and acetylation drive microtubule dynamics critical for platelet formation. *BMC Biology* [Internet]. 2018 Oct 18 [cited 2021 May 10];16(1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30336771/>
114. Brouhard GJ, Rice LM. Microtubule dynamics: An interplay of biochemistry and mechanics [Internet]. Vol. 19, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. Nature Publishing Group; 2018 [cited 2021 May 10]. p. 451–63. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29674711/>
115. Bartolini F, Andres-Delgado L, Qu X, Nik S, Ramalingam N, Kremer L, et al. An mDia1-INC2 formin activation cascade facilitated by IQGAP1 regulates stable microtubules in migrating cells. *Molecular Biology of the Cell* [Internet]. 2016 Jun 1 [cited 2021 May 10];27(11):1797–808. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27030671/>
116. Shin EK, Park H, Noh JY, Lim KM, Chung JH. Platelet shape changes and cytoskeleton dynamics as novel therapeutic targets for anti-thrombotic drugs [Internet]. Vol. 25, *Biomolecules and Therapeutics*. Korean Society of Applied Pharmacology; 2017 [cited 2021 May 10]. p. 223–30. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27871158/>
117. Suzuki A, Shin JW, Wang Y, Min SH, Poncz M, Choi JK, et al. RhoA Is Essential for Maintaining Normal Megakaryocyte Ploidy and Platelet Generation. *PLoS ONE* [Internet]. 2013 Jul 23 [cited 2021 May 10];8(7). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23935982/>
118. Pleines I, Hagedorn I, Gupta S, May F, Chakarova L, Van Hengel J, et al. Megakaryocyte-specific RhoA deficiency causes macrothrombocytopenia and defective platelet activation in hemostasis and thrombosis. *Blood* [Internet]. 2012 Jan 26 [cited 2021 Jun 27];119(4):1054–63. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22045984/>
119. Guidetti GF, Torti M, Canobbio I. Focal Adhesion Kinases in Platelet Function and Thrombosis. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* [Internet]. 2019 May 1 [cited 2021 May 10];39(5):857–68. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30894012/>
120. Vicente-Manzanares M, Ma X, Adelstein RS, Horwitz AR. Non-muscle myosin II takes centre stage in cell adhesion and migration [Internet]. Vol. 10, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. Nat Rev Mol Cell Biol; 2009 [cited 2021 May 10]. p. 778–90. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19851336/>
121. Akbar H, Shang X, Perveen R, Berryman M, Funk K, Johnson JF, et al. Gene targeting implicates Cdc42 GTPase in GPVI and non-GPVI mediated platelet filopodia formation, secretion and aggregation. *PLoS ONE* [Internet]. 2011 [cited 2021 May 10];6(7). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21789221/>
122. Pleines I, Hagedorn I, Gupta S, May F, Chakarova L, Van Hengel J, et al. Megakaryocyte-specific RhoA deficiency causes macrothrombocytopenia and defective platelet activation in hemostasis and thrombosis. *Blood* [Internet]. 2012 Jan 26 [cited 2021 May 10];119(4):1054–63. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22045984/>

## 8. ANEXOS

### 8.1. Anexo I



#### CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada Estudo do papel da proteína ARHGAP21 na formação das plaquetas e angiogênese, registrada com o nº 3090-1(B)/2018, sob a responsabilidade de Profa. Dra. Sara Teresinha Olalla Saad e Vanessa Aline Bernusso, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo *Chordata*, subfilo *Vertebrata* (exceto o homem) para fins de pesquisa científica (ou ensino), encontra-se de acordo com os preceitos da LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, do DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), tendo sido aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP, em 17 de julho de 2018.

Finalidade:	( ) Ensino ( X ) Pesquisa Científica
Vigência do projeto:	15/08/2018-15/08/2019
Vigência da autorização para manipulação animal:	15/08/2018-15/08/2019
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo transgênico / RRR629
No. de animais:	30
Idade/Peso:	08 semanas / 25g
Sexo:	machos
Origem:	Biotério do Laboratório de Biologia Molecular e Hemostasia, HEMOCENTRO/UNICAMP
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo isogênico / C57BL/6JUnib
No. de animais:	30
Idade/Peso:	08 semanas / 25g
Sexo:	machos
Origem:	CEMIB/UNICAMP
Biotério onde serão mantidos os animais:	Biotério do Laboratório de Biologia Molecular e Hemostasia, HEMOCENTRO/UNICAMP

A aprovação pela CEUA/UNICAMP não dispensa autorização prévia junto ao IBAMA, SISBIO ou CIBio e é restrita a protocolos desenvolvidos em biotérios e laboratórios da Universidade Estadual de Campinas.

Campinas, 17 de julho de 2018.

Prof. Dr. Wagner José Fávaro  
Presidente

Fátima Alonso  
Secretária Executiva

**IMPORTANTE:** Pedimos atenção ao prazo para envio do relatório final de atividades referente a este protocolo: até 30 dias após o encerramento de sua vigência. O formulário encontra-se disponível na página da CEUA/UNICAMP, área do pesquisador responsável. A não apresentação de relatório no prazo estabelecido impedirá que novos protocolos sejam submetidos.

## 8.2. Anexo II



CEUA/Unicamp

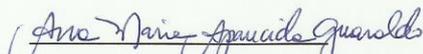
Comissão de Ética no Uso de Animais  
CEUA/Unicamp

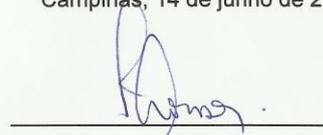
## CERTIFICADO

Certificamos que o projeto "Estudo do papel da proteína ARHGAP21 na formação das plaquetas e angiogênese" (protocolo nº 3090-1), sob a responsabilidade de Profa. Dra. Sara Teresinha Olalla Saad / Vanessa Aline Bernusso, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL) e com a legislação vigente, LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, e o DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009.

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP - em 14 de junho de 2013.

Campinas, 14 de junho de 2013.

  
Profa. Dra. Ana Maria A. Guaraldo  
Presidente

  
Fátima Alonso  
Secretária Executiva

## 8.3. Anexo III

BBA - Molecular Cell Research 1868 (2021) 119012



Contents lists available at ScienceDirect

BBA - Molecular Cell Research

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/bbamcr](http://www.elsevier.com/locate/bbamcr)

## Deficiency of ARHGAP21 alters megakaryocytic cell lineage responses and enhances platelet hemostatic function

Vanessa Aline Bernusso<sup>a</sup>, Karla P. Vieira<sup>a</sup>, Adriana S.S. Duarte<sup>a</sup>, Caroline Honaiser Lescano<sup>b</sup>,  
 Fabíola Zakia Mónica<sup>b</sup>, Cristina Pontes Vicente<sup>c</sup>, Erich Vinicius De Paula<sup>a</sup>, Sara Teresinha  
 Olalla Saad<sup>a,\*</sup>, Mariana Lazarini<sup>a,d,1</sup>

<sup>a</sup> Hematology and Transfusion Medicine Center, University of Campinas, Campinas, São Paulo, Brazil

<sup>b</sup> Department of Pharmacology, Faculty of Medical Sciences, University of Campinas, Campinas, São Paulo, Brazil

<sup>c</sup> Department of Structural and Functional Biology, Institute of Biology, University of Campinas, Campinas, São Paulo, Brazil

<sup>d</sup> Department of Pharmaceutical Sciences, Federal University of São Paulo, Diadema, São Paulo, Brazil

### ARTICLE INFO

#### Keywords:

Platelets  
 Megakaryocytes  
 Rho GTPase  
 Cytoskeleton  
 RHOA  
 CDC42  
 RhoGAP

### ABSTRACT

**Background:** Microtubules, actin and Rho GTPase proteins are essential players in the megakaryocyte biology for platelet formation and function.

**Objective:** To investigate the role of ARHGAP21, a RhoGAP protein, in megakaryocytic differentiation and platelet function.

**Method:** Cytoskeletal proteins were investigated in HEL cells silenced for ARHGAP21 and submitted to megakaryocyte differentiation. The role of Arhgap21 in platelet function was accessed using haploinsufficient (Arhgap21<sup>-/-</sup>) mice. Arhgap21<sup>+/-</sup> platelet aggregation and p-selectin exposure were evaluated in response to thrombin. Vessel occlusion time and thrombus formation were detected after injury of the carotid artery. Platelet morphology was accessed by electronic microscopy.

**Result:** ARHGAP21 was upregulated during megakaryocytic differentiation of the cell line and primary mouse cells. In the HEL cell model, ARHGAP21 was detected in the cytoplasmic protrusions, colocalized and associated with  $\alpha$ -tubulin and was weakly detected in the protein cell fraction containing the polymerized tubulin. Silencing of ARHGAP21 decreased the expression of Gln-tubulin, suggesting microtubule instability, and enhanced cell spreading. Platelets from Arhgap21<sup>-/-</sup> mice presented enhanced thrombin-induced aggregation and p-selectin exposure associated with increased size of  $\alpha$ -granules. Arhgap21<sup>-/-</sup> mice also showed increased CDC42 and RHOA activities, shorter tail-bleeding and accelerated thrombus formation.

**Conclusions:** Our results indicate that ARHGAP21 may be a critical protein in the regulation of platelet production and function through the control of cytoskeletal rearrangement.

### 1. Introduction

Platelets are well known for their role in stopping hemorrhage upon vascular injury. However, these small blood components also participate in other key biological processes, such as angiogenesis, wound healing, tumorigenesis, host response to virus and other pathogens [1–3]. Platelets are released from large bone marrow (BM) cells called megakaryocytes (MK), which, like other mature hematopoietic cells, are generated from the differentiation of pluripotent hematopoietic stem

cells [4]. Thousands of platelets have been estimated to be released by each megakaryocyte through a coordinate series of complex events that are, as yet, not fully understood [5]. Given the essential role of platelets in vital biological functions, understanding new proteins involved in this process is an important goal for ongoing research in the field of cell biology.

During maturation, MK become polyploid, increase their cytoplasm content, and develop a unique network of membrane channels known as the invaginated membrane system (IMS), that is believed to form the

\* Corresponding authors at: Hematology and Blood Transfusion Center, University of Campinas, Rua Carlos Chagas, 400 - Cidade Universitária Zeferino Vaz - Barão Geraldo, CEP: 13003-878 Campinas, São Paulo, Brazil.

E-mail addresses: [sara@unicamp.br](mailto:sara@unicamp.br) (S.T.O. Saad), [lazarini@unifesp.br](mailto:lazarini@unifesp.br) (M. Lazarini).

<sup>1</sup> These authors contributed equally to this work.

<https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2021.119012>

Received 22 May 2020; Received in revised form 4 March 2021; Accepted 8 March 2021

Available online 13 March 2021

0167-4899/Published by Elsevier B.V.