UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS

FERNANDA CAMILA ZAULI FABRIS

ASPECTOS DA ANGIOGÊNESE NA ANEMIA FALCIFORME: PAPEL DAS PLAQUETAS

CAMPINAS

2021

FERNANDA CAMILA ZAULI FABRIS

ASPECTOS DA ANGIOGÊNESE NA ANEMIA FALCIFORME: PAPEL DAS PLAQUETAS

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. NICOLA AMANDA CONRAN ZORZETTO

ESTE TRABALHO CORRESPONDE À VERSÃO FINAL
DA TESE DEFENDIDA PELA ALUNA FERNANDA
CAMILA ZAULI FABRIS, ORIENTADA PELA PROFA.
DRA NICOLA AMANDA CONRAN ZORZETTO.

CAMPINAS

2021

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

F115a

Fabris, Fernanda Camila Zauli, 1987-
Aspectos da angiogênese na anemia falciforme : o papel das plaquetas / Fernanda Camila Zauli Fabris. – Campinas, SP : [s.n.], 2021.

Orientador: Nicola Amanda Conran Zorzetto.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Anemoia falciforme. 2. Angiogenêse. 3. Plaquetas. I. Zorzetto, Nicola Amanda Conran, 1972-. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Aspects of angiogenesis in sickle cell disease : role of platelet
Palavras-chave em inglês:
Sickle cell disease
Angiogenesis
Platetet
Área de concentração: Fisiopatologia Médica
Titulação: Doutora em Ciências
Banca examinadora:
Nicola Amanda Conran Zorzetto [Orientador]
Sara Teresinha Olalla Saad
Cristina Pontes Vicente
Rodolfo Delfini Cançado
Andrea Ribeiro Soares
Data de defesa: 23-11-2021
Programa de Pós-Graduação: Fisiopatologia Médica

Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)
- ORCID do autor: https://orcid.org/0000-0001-8225-380X
- Currículo Lattes do autor: http://lattes.cnpq.br/8381508341761263

COMISSÃO EXAMINADORA DA DEFESA DE DOUTORADO

FERNANDA CAMILA ZAULI FABRIS

ORIENTADORA: PROFA. DRA. NICOLA AMANDA CONRAN ZORZETTO

MEMBROS TITULARES:

1. PROFA. DRA. NICOLA AMANDA CONRAN ZORZETTO

2. PROFA. DRA. SARA TERESINHA OLALLA SAAD

3. PROFA. DRA. CRISTINA PONTES VICENTE

4. PROF. DR. RODOLFO DELFINI CANÇADO

5. PROFA. DRA. ANDREA RIBEIRO SOARES

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: 23/11/2021

Dedico este trabalho ao meu esposo, Maurício Fabris, a quem agradeço pelo apoio e amor, por investir no meu crescimento pessoal, pela paciência, pela confiança, por estar sempre ao meu lado e acreditar no meu potencial.

AGRADECIMENTOS

À **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)**, pela bolsa de Doutorado concedida (processo nº 2017/11061-6).

À **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES)** - O presente trabalho contou com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

À minha orientadora, **Dra. Nicola Amanda Conran Zorzetto**, pela oportunidade, pela paciência e pela confiança que depositou em mim e no meu trabalho. Por todos os ensinamentos, desde a minha iniciação científica, que proporcionaram o meu crescimento pessoal e profissional e, acima de tudo, o meu interesse pela pesquisa. Nic você é uma inspiração para mim. Sempre serei grata por ter tido a honra de trabalhar com uma pesquisadora como você.

À **Lidiane Torres**, pela amizade, por sua disponibilidade em me auxiliar no dia-a-dia das minhas atividades e continuar me ajudando mesmo com a distância. Obrigada por tudo que fez por mim dentro ou fora do laboratório.

Aos amigos do grupo de pesquisa, que contribuíram para a realização deste trabalho. Em especial a **Érica Gotardo**, que me auxiliou nos experimentos *in vivo*, de forma carinhosa e respeitosa; e a **Flávia Costa Leonardo**, por todo apoio e suporte. Obrigada por dedicarem parte do tempo de vocês para me auxiliarem.

Ao meu esposo, **Maurício Fabris**, pelo companheirismo e suporte. Essa conquista é nossa. Te amo.

Aos meus pais, **Wilson Zauli e Andreia Leonardi Zauli**, por todos os ensinamentos. Meus avós pelo carinho e aconchego. Amo vocês!

À minha irmã e amiga, **Gabriela L. Zauli Belem**, por me ouvir nos momentos de desespero, pelas palavras de afeto, carinho e por me fazer acreditar em mim. Te amo.

Aos meus filhos, **Flávio, Flávia, Fabrício e Arthur**, que mesmo em uma fase tão difícil de suas vidas, tiveram que entender que a mamãe não poderia parar de estudar e se dedicar ao trabalho. Vocês são o maior presente que eu poderia ter. Obrigada por tudo e por me ensinarem o quanto eu sou forte. Amarei vocês eternamente.

Aos amigos que passaram pelo laboratório e participaram dessa importante etapa na minha vida**. Felipe Vendrame, Hannan Chweih, Wilson Vetera, Angélica Silveira, Lediana Telles, Rafaela Mendonça, Pamela Lara e Juliete F. Silva.** A companhia de vocês fez toda a diferença durante esse período, eu aprendi muito com todos vocês.

A equipe de enfermagem do ambulatório de hematologia do Hemocentro da Unicamp, por me auxiliar na coleta das amostras, pelo carinho e acolhimento que sempre recebi.

A todos os professores e amigos da graduação e pós-graduação, pelo aprendizado.

Agradeço a **Deus**, pela vida e pela realização de mais um sonho. Obrigada meu Papai!

RESUMO

A Doença Falciforme (DF) é causada por uma mutação genética que resulta na substituição de um único aminoácido da cadeia da β-globina, levando à formação de uma hemoglobina anômala conhecida como hemoglobina S. Em situações de baixas concentrações de oxigênio, a hemoglobina se polimeriza, levando as hemácias a assumirem um formato alongado, em um evento conhecido como falcização. A angiogênese é o processo pelo qual ocorre a formação de novos vasos a partir de vasos pré-existentes. Estudos mostraram que pacientes com DF, no geral, apresentam níveis elevados de fatores angiogênicos plasmáticos e que as plaquetas de pacientes com anemia falciforme (AF) podem circular em estado ativado na circulação sanguínea. Como já é conhecido que as plaquetas funcionam como reservatórios de fatores envolvidos na inflamação e na angiogênese, o objetivo deste projeto foi avaliar o papel das plaquetas de pacientes com DF nos principais mecanismos angiogênicos das células endoteliais *in vitro*, utilizando células endoteliais humanas de cordão umbilical (HUVEC). As células HUVEC foram co-cultivadas com plaquetas separadas do sangue periférico de pacientes portadores de AF (HbSS) e DF (HbSC), e de indivíduos sadios (HbAA) por 24 horas. A quantificação das células HUVEC em proliferação se deu através de um kit comercial (BrdU). Para avaliação da formação de estruturas tipo capilares pelas células endoteliais (CE) utilizou-se matriz GFR-Matrigel. Os ensaios de invasão e migração foram realizados em câmara dupla de Matrigel e por meio da técnica de *Scratch.* A análise do secretoma e da expressão de receptores na superfície de plaquetas foi feita através do ensaio de multiplex e citometria de fluxo. Os resultados do estudo indicam que as plaquetas de pacientes com DF (HbSS e HbSC) e controle podem estimular a formação de estruturas capilares, a invasão e a migração das CE, *in vitro*. Nossos achados também demonstram que o co-cultivo de CE com plaquetas de pacientes com AF, no mesmo poço, resulta no aumento da capacidade de invasão das CE. Em relação a análise da secretoma das plaquetas, observamos que, em 24 horas, as plaquetas de pacientes com AF secretam concentrações elevadas dos fatores pró-angiogênicos ANG 1, angiogenina, e PDGF AA, e do fator anti-angiogênico, endostatina. Também, mostramos que as plaquetas de pacientes com AF do nosso grupo de pesquisa apresentam um aumento na expressão do receptor de trombina, PAR-1. Nosso trabalho reforça a hipótese

de que as plaquetas participam do processo angiogênico da AF e abre perspectivas para novos estudos. Considerando que pacientes com DF possuem contagens elevadas de plaquetas, destacamos as plaquetas como um alvo terapêutico no tratamento da DF.

Palavras chaves: Doença falciforme; Angiogênese; Plaquetas.

ABSTRACT

Sickle cell disease (SCD) is caused by a genetic mutation that results in the substitution of a single amino acid in the β-globin chain, leading to the formation of an anomalous hemoglobin known as hemoglobin (HbS). At low blood oxygen concentrations, HbS polymerizes and red blood cells undergo sickling. Angiogenesis is the process by which the formation of new vessels occurs from pre-existing vessels. Previous studies have shown that patients with SCD have increased levels of plasma angiogenic factors, which indicates a proangiogenic state in these individuals, and that platelets from patients with sickle cell anemia (SCA) circulate in an activated state in the bloodstream. As platelets are known to serve as reservoirs for factors involved in inflammation and angiogenesis, the aim of this project was to evaluate the role of platelets from SCD patients in the major angiogenic mechanisms of endothelial cells *in vitro*, using Human Umbilical Vein Endothelial Cells (HUVEC). HUVEC cells were co-cultured with platelets isolated from the peripheral blood of patients with SCA (HbSS) and SCD (HbSC), and from healthy individuals (HbAA) for 24 hours. The quantification of proliferating cells was carried out using a commercial kit (BrdU), and HUVEC were cultured in the presence and absence of platelets on GFR-Matrigel matrix to assess the formation of capillary-like structures by endothelial cells. Invasion and migration assays were performed in dual chamber plates using Matrigel, and the Scratch technique, respectively. The secretome and the expression of receptors on the surface of platelets were analyzed using multiplex assays and flow cytometry. Our data indicate that SCD and control platelets can stimulate the formation of capillary structures, and the invasion and migration of endothelial cells (EC), *in vitro*. Our findings also show that the co-cultivation of EC with SCA platelets, in the same well, results in increased EC invasiveness. SCA platelets were found to secrete, during a 24-hour period, increased levels of the pro-angiogenic factors, Ang 1, angiogenin and PDGF-AA, and the anti-angiogenic factor endostatin, and presented an increased expression of the PAR-1 thrombin receptor. Our work reinforces the hypothesis that platelets participate in the angiogenic process of SCA and provides perspectives for further studies. Given the increased circulating platelet counts associated with SCD, data further highlight the platelets as a therapeutic target for the treatment of SCD.

Key words: Sickle cell disease; Angiogenesis; Platelets.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADP: Adenosina difosfato

AF: Anemia Falciforme HbSS

ANG: Angiopoitina

ATP: Adenosina trifosfato

AVC: Acidente vascular cerebral

DAMPS: Damage-associated molecular patterns

DF: Doença falciforme

FDA Food and Drug Administration

FGF: Fator de crescimento de fibroblastos

HbA: Hemoglobina A

HbL: Hemoglobina livre

HbS: Hemoglobina S

HIF-1: Hypoxia Inducible Factor

HU: Hidroxiuréia

MIF: Média de fluorescência

NET: Armadilhas extracelulares de neutrófilos

NO: Óxido nitríco

PAR: Protease-activated receptor

PDGF: Fator de crescimento derivado de plaquetas

PIGF: Fator de crescimento placentário.

PRP: Plasma rico em plaquetas

ROS: Espécimes reativas de oxigênio

SC: Doença falciforme HbSC

SCA: Sickle Cell Anemia

SCD: Sickle Cell Disease

SSC/FSC: Side scatter/forward scatter

VEGF: Fator de crescimento vascular endotelial

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1: PROCESSO VASO-OCLUSIVO NA ANEMIA FALCIFORME. A LIBERAÇÃO DE HEMOGLOBINA LIVRE E HEME NA CIRCULAÇÃO DIMINUI A BIODISPONIBILIDADE DE ÓXIDO NÍTRICO (NO), CAUSANDO VASOCONSTRIÇÃO E INDUZINDO A LIBERAÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO. A ATIVAÇÃO DO ENDOTÉLIO RESULTA NA ADESÃO DE VÁRIOS TIPOS CELULARES, COMO HEMÁCIAS (RBC) E LEUCÓCITOS, ALÉM DE PLAQUETAS ATIVADAS. A VASOCONSTRIÇÃO E A OBSTRUÇÃO FÍSICA DO VASO, DEVIDO AO RECRUTAMENTO CELULAR E A FORMAÇÃO DE AGREGADOS HETEROCELULARES, OCASIONAM REDUÇÃO NO FLUXO SANGUÍNEO, HIPÓXIA E A CONSEQUENTE FALCIZAÇÃO DAS HEMÁCIAS, DIFICULTANDO A PASSAGEM DO SANGUE E, FINALMENTE, RESULTANDO NA VASO-OCLUSÃO. ADAPTADO DE MENDONÇA ET AL. (19). 26

FIGURA 2: PRINCIPAIS EVENTOS ENVOLVIDOS NO PROCESSO DE ANGIOGÊNESE. FATORES ANGIOGÊNICOS, COMO O FATOR DE CRESCIMENTO ENDOTELIAL VASCULAR (VEGF), SE LIGAM A RECEPTORES ESPECÍFICOS NAS CÉLULAS ENDOTELIAIS (CE) ADJACENTES, ATIVANDO-AS. ENTÃO, INICIAM-SE A PROLIFERAÇÃO E A MIGRAÇÃO DE CE ATÉ O LOCAL DO TECIDO DOENTE E, CONFORME OS VASOS SANGUÍNEOS SE ESTENDEM, O TECIDO É REMODELADO AO REDOR DO VASO. AS CE EM DESENVOLVIMENTO MIGRAM PARA FORMAR UM NOVO VASO SANGUÍNEO, E VASOS SANGUÍNEOS INDIVIDUAIS SE CONECTAM, FORMANDO UM CIRCUITO POR ONDE O SANGUE PODE CIRCULAR. ADAPTADO DE CLAPP ET AL. (86)..... 30

FIGURA 3:ILUSTRAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE CULTIVO CELULAR USADAS PARA OS ENSAIOS DE INVASÃO CELULAR EM CÂMARA DUPLA DE MATRIGEL. I) PLAQUETAS E CÉLULAS ENDOTELIAIS NO COMPARTIMENTO SUPERIOR; II) PLAQUETAS NO COMPARTIMENTO INFERIOR E CÉLULAS ENDOTELIAIS NO COMPARTIMENTO SUPERIOR. 40

FIGURA 4: PAINEL DE CITOMETRIA DA 16ª PASSAGEM DAS CÉLULAS ENDOTELIAIS EM CULTURA (HUVEC) UTILIZADAS NO ESTUDO. OS SCATTER PLOTS A, B E C CORRESPONDEM AO BRANCO (CÉLULAS SEM MARCAÇÃO). (A) SCATTER PLOT REPRESENTATIVO DEMONSTRANDO FSC (FORWARD SCATTER; INDICATIVO DE TAMANHO) X SSC (SIDE SCATTER; INDICATIVO DE GRANULOSIDADE) DAS CÉLULAS E O GATING DAS CÉLULAS. (B) E (C) REPRESENTAM O CONTROLE DA NÃO MARCAÇÃO DAS CÉLULAS PELOS FLUOROCRÔMOS ESTUDADOS; D) REPRESENTA A MÉDIA DE INTENSIDADE DE FLUORESCÊNCIA (MIF) PARA A MARCAÇÃO DO ANTICORPO ANTI-CD105-PE; E) DEMONSTRA AS MIF PARA AS MARCAÇÕES DOS ANTICORPOS ANTI-CD34-FITC E ANTI-CD144-PE; F) REPRESENTA AS MIF PARA AS MARCAÇÕES DOS ANTICORPOS ANTI-CD31-FITCH E ANTI-CD146-PE; G) REPRESENTA AS MIF PARA AS MARCAÇÕES DOS ANTICORPOS ANTI-CD133-APC E ANTI-CD45- PERCP. 45

FIGURA 5: EXPRESSÃO (% E MIF) DAS MOLÉCULAS P-SELECTINA (A E B) E CD41A (C E D) E DA ATIVIDADE DE AIIBB3 (E E F) NAS PLAQUETAS DE PACIENTES COM ANEMIA FALCIFORME E CONTROLES. DETERMINADO POR CITOMETRIA DE FLUXO NO PLASMA RICO EM PLAQUETAS (PRP, $1X10^6$ PLAQUETAS/TUBO) DE INDIVÍDUOS CONTROLE (AA, N=7) E PACIENTES COM ANEMIA FALCIFORME (SS,

n=7). Resultados expressos como média. MIF, média de intensidade de fluorescência. P>0,05; comparando o grupo SS ao grupo AA, determinado pelo teste de Mann Whitney. 49

Figura 6: Expressão (% e MIF) dos receptores de trombina PAR-1 (A e B) e PAR-4 (C e D) nas plaquetas de pacientes com anemia falciforme e controles. Análise por citometria de fluxo, realizada a partir do plasma rico em plaquetas (PRP, $1x10^6$ plaquetas/tubo) de indivíduos controle (AA) e pacientes com anemia falciforme (SS). MIF, média de intensidade de fluorescência. Resultados expressos como média. *P<0,05 comparado ao grupo AA, determinado pelo teste de Mann Whitney. 50

Figura 7: Efeitos das plaquetas de indivíduos saudáveis, em diferentes concentrações, na viabilidade das células HUVEC, através da técnica de MTS. As células endoteliais foram cultivadas por 24 horas na presença de meio de cultura F12 K (basal) e plaquetas em estado basal na concentração de $1x10^6$ plaquetas/ml (n=7); $1x10^7$ plaquetas/ml (n=3) e $1x10^8$ plaquetas/ml (n=7). Cada barra representa a média. Foram realizados 3 experimentos independentes em triplicata. 51

Figura 8: Avaliação do efeito das plaquetas na viabilidade celular de células endoteliais HUVEC, pela técnica de MTS. Plaquetas isoladas ($1x10^5$ plaquetas/poço) de indivíduos controle (AA), pacientes com anemia falciforme (SS), em uso de hidroxiureia (HU) ou não (SHU), foram co-cultivadas na presença das células endoteliais HUVEC em cultura ($1x10^4$ células/poço) por 24 horas. As HUVEC foram incubadas na presença de meio de cultura F12 K, suplementado com 2% de soro fetal bovino (grupo basal). Como controle positivo (CP) de morte celular, as células foram incubadas na ausência de meio de cultura e na presença de PBS. Cada barra representa a média. **P<0,01, comparado aos outros grupos, determinado por Kruskal Wallis, seguido pelo teste de Dunn..... 52

Figura 9: Imagens representativas das estruturas tipo capilar das células HUVEC cultivadas com diferentes concentrações de plaquetas. Plaquetas isoladas de indivíduos saudáveis foram cultivadas na presença de (A) meio de cultura F12K suplementado com SFB 2% (basal), B) meio de cultura F12K suplementado com SFB 2% + $1x10^6$ plaquetas/ml, C) $1x10^7$ plaquetas/ml e D) $1x10^8$ plaquetas/ml. As imagens A, B, e C são representativas de poços da cultura, após 20 horas de incubação, em microscópio invertido (aumento de 40X, equipamento Zeiss Axiovert S100) de contraste de fase com câmera acoplada (Moticam 2500). É possível notar nas imagens C e D a presença de um borrão (cor escurecida) que dificulta a análise dos capilares. 53

Figura 10: Avaliação da formação de estruturas capilares a partir do co-cultivo de células endoteliais com plaquetas de pacientes em uso ou não de hidroxiuréia. Foram utilizadas células HUVEC ($5x10^3$ células/poço) cultivadas em meio de cultura F12K com SFB 2% (basal, n=11) e plaquetas isoladas ($1x10^5$ plaquetas/poço) de pacientes com anemia falciforme (SS), em uso de hidroxiuréia (HU, n=9) e pacientes que não faziam uso da HU (SHU, n=3). Número de

ESTRUTURAS CAPILARES (RAMOS UNIDOS POR 2 PONTOS DE RAMIFICAÇÕES). B) NÚMERO DE PONTOS DE RAMIFICAÇÕES (EXTREMIDADES QUE SE RAMIFICAM EM UM OU MAIS RAMOS). C) NÚMERO DE MALHAS (LOOPS). RESULTADOS EXPRESSOS COMO MÉDIA. *P<0,05; **P<0,01 ***P<0,001, COMPARADO AO BASAL, DETERMINADO POR KRUSKAL WALLIS, SEGUIDO PELO DO TESTE DE DUNN. 54

FIGURA 11: IMAGENS REPRESENTATIVAS DAS ESTRUTURAS TIPO CAPILARES FORMADAS A PARTIR DA CO-CULTURA DE CÉLULAS ENDOTELIAIS E PLAQUETAS ISOLADAS. FOTOS TIRADAS DOS POÇOS CONTENDO CÉLULAS HUVEC ($5x10^4$ CÉLULAS/ML) APÓS A INCUBAÇÃO POR 20 HORAS EM MEIO DE CULTURA F12K COM SFB 2% (BASAL) OU COM PLAQUETAS ($1x10^6$ PLAQUETAS/ML, 100µL) DE INDIVÍDUOS CONTROLE (AA) E PACIENTES COM ANEMIA FALCIFORME (SS). OS ENSAIOS FORAM REALIZADOS EM TRIPLICATA E VISUALIZADOS ATRAVÉS DE MICROSCÓPIO INVERTIDO (AUMENTO DE 40X). 55

FIGURA 12: QUANTIFICAÇÃO DAS ESTRUTURAS CAPILARES DE CÉLULAS HUVEC ($5x10^3$ CÉLULAS/POÇO) CULTIVADAS EM MEIO DE CULTURA F12K COM SFB 2% (BASAL, N=11) E PLAQUETAS ISOLADAS ($1x10^5$ PLAQUETAS/POÇO) DE INDIVÍDUOS SAUDÁVEIS (AA; N=9) OU DE PACIENTES COM ANEMIA FALCIFORME (SS; N=9). A) NÚMERO DE ESTRUTURAS CAPILARES (RAMOS UNIDOS POR 2 PONTOS DE RAMIFICAÇÕES). B) NÚMERO DE PONTOS DE RAMIFICAÇÕES (EXTREMIDADES QUE SE RAMIFICAM EM UM OU MAIS RAMOS). C) NÚMERO DE NÓS (EXTREMIDADES EM QUE SE CONECTAM DOIS OU MAIS RAMOS). D) NÚMERO DE MALHAS DE CAPILARES (LOOPS). E) TAMANHO TOTAL DOS CAPILARES. F) NÚMERO DE SEGMENTOS ISOLADOS (PONTOS QUE NÃO FORMAM RAMOS). RESULTADOS EXPRESSOS COMO MÉDIA. *P<0,05; **P<0,01 ***P<0,001, COMPARADO AO BASAL, DETERMINADO POR KRUSKAL WALLIS, SEGUIDO PELO DO TESTE DE DUNN. 56

FIGURA 13: COMPARAÇÃO DA QUANTIFICAÇÃO DAS ESTRUTURAS CAPILARES DE CÉLULAS HUVEC NA PRESENÇA DE PLASMA RICO EM PLAQUETAS OU PLAQUETAS ISOLADAS. CÉLULAS HUVEC ($5x10^3$ CÉLULAS/POÇO) FORAM CULTIVADAS EM MEIO DE CULTURA F12K COM SFB 2% (BASAL) E NA PRESENÇA DE PLASMA RICO EM PLAQUETAS (PRP, $1x10^5$ PLAQUETAS/POÇO) OU PLAQUETAS ISOLADAS ($1x10^5$ PLAQUETAS/POÇO) DE INDIVÍDUOS SAUDÁVEIS (AA), PACIENTES COM ANEMIA FALCIFORME EM USO CONTÍNUO DE HIDROXIUREIA (SS). A) NÚMERO DE ESTRUTURAS CAPILARES (RAMOS UNIDOS POR 2 PONTOS DE RAMIFICAÇÕES). B) NÚMERO DE PONTOS DE RAMIFICAÇÕES (EXTREMIDADES QUE SE RAMIFICAM EM UM OU MAIS RAMOS).C) NÚMERO DE MALHAS DE CAPILARES (LOOPS). RESULTADOS EXPRESSOS COMO MÉDIA. *P<0,05; **P<0,01 ***P<0,001, COMPARADO AO BASAL, #P<0,05, COMPARAÇÃO ENTRE PRP E PLAQUETAS DE PACIENTES SS, DETERMINADO POR KRUSKAL WALLIS, SEGUIDO PELO DO TESTE DE DUNN. 58

FIGURA 14: EFEITO DAS PLAQUETAS DE INDIVÍDUOS CONTROLES (AA, N=9) OU DE PACIENTES COM ANEMIA FALCIFORME (SS, N=9) NA PROLIFERAÇÃO DAS CÉLULAS ENDOTELIAIS (HUVECS). AS HUVEC ($1x10^4$ CÉLULAS/POÇO) FORAM INCUBADAS NA PRESENÇA DE MEIO DE CULTURA F12 K, SUPLEMENTADO COM SFB 2% NA PRESENÇA DE PLAQUETAS ISOLADAS DE INDIVÍDUOS CONTROLES OU PACIENTES COM AF ($1x10^5$ PLAQUETAS/POÇO). CADA BARRA REPRESENTA A MÉDIA. NÃO FORAM ENCONTRADAS DIFERENÇAS ENTRE OS GRUPOS, DETERMINADO POR KRUSKAL WALLIS, SEGUIDO PELO DO TESTE DE DUNN. 59

FIGURA 15: ENSAIO DE INVASÃO DAS CÉLULAS HUVEC ($2,5x10^3$ CÉLULAS/POÇO), EM CÂMARA DUPLA DE MATRIGEL, NA PRESENÇA DE PLAQUETAS ISOLADAS ($5x10^5$ PLAQUETAS/POÇO) DE INDIVÍDUOS CONTROLE (AA) E PACIENTES COM ANEMIA FALCIFORME (SS). A) IMAGENS REPRESENTATIVAS DAS MEMBRANAS (CONDIÇÃO I), B) HUVECS CULTIVADAS NO POÇO SUPERIOR E AS PLAQUETAS NO POÇO INFERIOR, SEPARADAS POR INSERTOS TRANSWELL (CONDIÇÃO I); C) HUVECS E PLAQUETAS CULTIVADAS EM CONTATO, NO POÇO SUPERIOR (CONDIÇÃO II). RESULTADOS EXPRESSOS COMO MÉDIA. **P<0, 01, COMPARADO AO BASAL, DETERMINADO POR KRUSKAL WALLIS, SEGUIDO PELO DO TESTE DE DUNN..... 60

FIGURA 16: COMPARAÇÃO DA CAPACIDADE DE INVASÃO CELULAR DAS CÉLULAS ENDOTELIAIS CO-CULTIVADAS NA PRESENÇA DE PLAQUETAS ISOLADAS OU PLASMA RICO EM PLAQUETAS DE INDIVÍDUOS CONTROLES (AA) E PACIENTES COM ANEMIA FALCIFORME (SS). ENSAIO DE INVASÃO DAS CÉLULAS HUVEC ($2,5x10^3$ CÉLULAS/POÇO) EM CÂMARA DUPLA DE MATRIGEL, NA PRESENÇA DE PLASMA RICO EM PLAQUETAS (PRP, $5x10^5$ PLAQUETAS/POÇO) E PLAQUETAS ISOLADAS ($5x10^5$ PLAQUETAS/POÇO) DE INDIVÍDUOS CONTROLE (AA) E PACIENTES COM ANEMIA FALCIFORME (SS). RESULTADOS EXPRESSOS COMO MÉDIA. **P<0,01, COMPARADO AO BASAL, DETERMINADO POR KRUSKAL WALLIS, SEGUIDO PELO DO TESTE DE DUNN. 61

FIGURA 17: ENSAIO DE MIGRAÇÃO DAS CÉLULAS HUVEC NA PRESENÇA DE PLAQUETAS DE INDIVÍDUOS CONTROLE (AA, N=6) E PACIENTES COM ANEMIA FALCIFORME (SS, N=11), PELA TÉCNICA DE SCRATCH. AS HUVEC ($5x10^4$ CÉLULAS/POÇO) FORAM INCUBADAS NA PRESENÇA DE MEIO DE CULTURA F12 K, SUPLEMENTADO COM SFB 2%, GRUPO BASAL (N=7), OU NA PRESENÇA DE PLAQUETAS ISOLADAS ($5x10^5$ PLAQUETAS/POÇO) OU VEGF (10 NG/ML, CONTROLE POSITIVO, N=3). A) IMAGENS REPRESENTATIVAS; B) PORCENTAGEM DE CÉLULAS HUVECS QUE MIGRARAM EM COMPARAÇÃO AO TEMPO 0. RESULTADOS EXPRESSOS COMO MÉDIA E ERRO PADRÃO. *P<0,05; COMPARADO AO BASAL, DETERMINADO POR KRUSKAL WALLIS, SEGUIDO PELO DO TESTE DE DUNN. 63

FIGURA 18: ANÁLISE DO SECRETOMA DE FATORES PRÓ-ANGIOGÊNICO NO SOBRENADANTE DE PLAQUETAS ISOLADAS DE INDIVÍDUOS CONTROLES E PACIENTES COM AF. CONCENTRAÇÕES DE: A) ANGIOPOITINA 1, B) ANGIOGENINCA, C) FATOR DE CRESCIMENTO DERIVADO DE FIBROBLASTOS, D) FATOR DE CRESCIMENTO PLACENTÁRIO, E) FATOR DE CRESCIMENTO DERIVADO DE PLAQUETAS AA, F) FATOR DE CRESCIMENTO DERIVADO DE PLAQUETAS BB, G) DO FATOR DE CRESCIMENTO VASCULAR, DETECTADAS NO SOBRENADANTE DE PLAQUETAS ISOLADAS ($5x10^4$ PLAQUETAS/POÇO) DE INDIVÍDUOS SAUDÁVEIS (AA) E PACIENTES COM ANEMIA FALCIFORME (SS) INCUBADAS POR 20 HORAS. RESULTADOS EXPRESSOS COMO MÉDIA. *P<0,05; COMPARADO AO GRUPO CONTROLE AA, DETERMINADO POR TESTE DE MANN WHITNEY. 65

FIGURA 19: ANÁLISE DO SECRETOMA DE FATORES ANTI-ANGIOGÊNICOS NO SOBRENADANTE DE PLAQUETAS. CONCENTRAÇÕES DE A) ENDOSTATINA E B) TROMBOSPONDINA-2 NO SOBRENADANTE DE PLAQUETAS ISOLADAS ($5x10^4$ PLAQUETAS/POÇO) DE INDIVÍDUOS SAUDÁVEIS (AA) E PACIENTES COM ANEMIA FALCIFORME (SS) INCUBADAS POR 20 HORAS. RESULTADOS EXPRESSOS COMO MÉDIA. *P<0,05; COMPARADO AO GRUPO CONTROLE AA, DETERMINADO POR TESTE MANN WHITNEY..... 66

FIGURA 20: ANÁLISE DO PERFIL DE FATORES PRÓ-ANGIOGÊNICOS NO SOBRENADANTE DA CO-CULTURA DE CÉLULAS HUVECS E PLAQUETAS. CONCENTRAÇÕES DE: A) ANGIOPOITINA 1, B) ANGIOGENINA, C) FATOR DE CRESCIMENTO DERIVADO DE FIBROBLASTOS, D) FATOR DE CRESCIMENTO PLACENTÁRIO, E) FATOR DE CRESCIMENTO DERIVADO DE PLAQUETAS AA, F) FATOR DE CRESCIMENTO DERIVADO DE PLAQUETAS BB, G) FATOR DE CRESCIMENTO VASCULAR, NO SOBRENADANTE DA CO-CULTURA DE CÉLULAS ENDOTELIAIS (HUVEC, $1x10^5$ CÉLULAS/ML) E PLAQUETAS ISOLADAS ($5x10^4$ PLAQUETAS/POÇO), DE INDIVÍDUOS SAUDÁVEIS (AA) E PACIENTES COM ANEMIA FALCIFORME (SS). AS HUVECS FORAM CO-CULTIVADAS COM AS PLAQUETAS (20H, 37°C). O GRUPO BASAL FOI CULTIVADO NAS MESMAS CONDIÇÕES (F12K, SFB 2%). O GRUPO DE HUVEC INCUBADAS COM VEGF (10NG/ML) FOI USADO COMO CONTROLE POSITIVO. RESULTADOS EXPRESSOS COMO MÉDIA.DETERMINADO POR KRUSKAL WALLIS, SEGUIDO PELO DO TESTE DE DUNN. 68

FIGURA 21: ANÁLISE DO PERFIL DE FATORES ANTI-ANGIOGÊNICOS NO SOBRENADANTE DA CO-CULTURA DE CÉLULAS HUVECS E PLAQUETAS. CONCENTRAÇÕES DE A) ENDOSTATINA E B) TROMBOSPONDINA-2 NO SOBRENADANTE DA CO-CULTURA DE CÉLULAS ENDOTELIAIS (HUVEC, $1x10^5$ CÉLULAS/ML) E PLAQUETAS ISOLADAS ($5x10^4$ PLAQUETAS/POÇO) DE INDIVÍDUOS SAUDÁVEIS (AA) E PACIENTES COM ANEMIA FALCIFORME (SS). AS HUVECS FORAM CO-CULTIVADAS COM AS PLAQUETAS (20H, 37°C). O GRUPO BASAL FOI CULTIVADO NAS MESMAS CONDIÇÕES (F12K 2%). O GRUPO DE HUVEC CULTIVADAS COM VEGF (10NG/ML) FOI USADO COMO CONTROLE POSITIVO. RESULTADOS EXPRESSOS COMO MÉDIA. DETERMINADO POR KRUSKAL WALLIS, SEGUIDO PELO DO TESTE DE DUNN. 69

FIGURA 22: EXPRESSÃO (% E MIF) DAS MOLÉCULAS P-SELECTINA E CD41A E DA ATIVIDADE DE AIIBB3 NO PRP DE PACIENTES COM DOENÇA FALCIFORME SC E INDIVÍDUOS CONTROLES. A) % DE EXPRESSÃO DE P-SELECTINA, B) MÉDIA DE INTENSIDADE DE FLUORESCÊNCIA DE P-SELECTINA, C) % DE EXPRESSÃO DE CD41A, D) MÉDIA DE INTENSIDADE DE FLUORESCÊNCIA DE CD41A NAS PLAQUETAS. E) % DE PLAQUETAS APRESENTANDO A INTEGRINA AIIBB3 NA SUA CONFORMAÇÃO ATIVADA, F) MÉDIA DE INTENSIDADE DE FLUORESCÊNCIA DA AIIBB3 ATIVADA. EXPRESSÕES AVALIADOS POR CITOMETRIA DE FLUXO DO PLASMA RICO EM PLAQUETAS (PRP, $1x10^6$ PLAQUETAS/TUBO) DE INDIVÍDUOS CONTROLE (AA, N=7) E PACIENTES COM DOENÇA FALCIFORME (SC, N=9). RESULTADOS EXPRESSOS COMO MÉDIA. P>0,05, COMPARADO AO GRUPO AA, DETERMINADO POR TESTE DE MANN WHITNEY. 72

FIGURA 23: EXPRESSÃO DOS RECEPTORES DE TROMBINA NA SUPERFÍCIE DE PLAQUETAS DE PACIENTES COM DOENÇA FALCIFORME SC E INDIVÍDUOS CONTROLES. A) % DE EXPRESSÃO DE PAR-1, B) MÉDIA DE INTENSIDADE DE FLUORESCÊNCIA DE PAR-1, C) % DE EXPRESSÃO DE PAR-4 E D) MÉDIA DE INTENSIDADE DE FLUORESCÊNCIA DE PAR-4 NAS PLAQUETAS DO PLASMA RICO EM PLAQUETAS (PRP, $1x10^6$ PLAQUETAS/TUBO) DE INDIVÍDUOS CONTROLE (AA) E PACIENTES COM DOENÇA FALCIFORME SC (SC). RESULTADOS EXPRESSOS COMO MÉDIA. DETERMINADO POR KRUSKAL WALLIS, SEGUIDO PELO DO TESTE DE DUNN. 73

FIGURA 24: QUANTIFICAÇÃO DAS ESTRUTURAS CAPILARES DE CÉLULAS HUVEC ($5x10^3$ CÉLULAS/POÇO) CULTIVADAS COM PLAQUETAS ISOLADAS ($1x10^5$ PLAQUETAS/POÇO) DE INDIVÍDUOS SAUDÁVEIS (AA;

N=9) E PACIENTES COM DOENÇA FALCIFORME SC (SC; N=6). A) NÚMERO DE ESTRUTURAS CAPILARES (RAMOS UNIDOS POR 2 PONTOS DE RAMIFICAÇÕES). B) NÚMERO DE PONTOS DE RAMIFICAÇÕES (EXTREMIDADES QUE SE RAMIFICAM EM UM OU MAIS RAMOS). C) NÚMERO DE MALHAS DE CAPILARES (LOOPS). RESULTADOS EXPRESSOS COMO MÉDIA. *P<0,05; **P<0,01 ***P<0,001, COMPARADO AO BASAL, DETERMINADO POR KRUSKAL WALLIS, SEGUIDO PELO DO TESTE DE DUNN. 75

FIGURA 25: AVALIAÇÃO DO EFEITO DAS PLAQUETAS ($1X10^5$ PLAQUETAS/POÇO) DE INDIVÍDUOS CONTROLE (AA) E PACIENTES COM DOENÇA FALCIFORME SC NAS CÉLULAS ENDOTELIAIS. A) VIABILIDADE DAS CÉLULAS ENDOTELIAIS HUVEC, PELA TÉCNICA DE MTS E B) PROLIFERAÇÃO CELULAR DAS CÉLULAS ENDOTELIAIS, PELA TÉCNICA DE BRDU. HUVEC ($1X10^4$ CÉLULAS/POÇO) FORAM INCUBADAS NA PRESENÇA DE MEIO DE CULTURA F12 K, SUPLEMENTADO COM SFB 2% , GRUPO BASAL. COMO CONTROLE POSITIVO (CP) DE MORTE CELULAR, AS CÉLULAS FORAM INCUBADAS NA AUSÊNCIA DE MEIO DE CULTURA E NA PRESENÇA DE PBS. CADA BARRA REPRESENTA A MÉDIA. **P<0,01, COMPARADO AO BASAL, DETERMINADO POR KRUSKAL WALLIS, SEGUIDO PELO DO TESTE DE DUNN**.** 76

FIGURA 26: AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DE INVASÃO E MIGRAÇÃO DE CÉLULAS ENDOTELIAIS CO-CULTIVADAS COM PLAQUETAS ISOLADAS DE PACIENTES COM DOENÇA FALCIFORME SC E CONTROLES. A) INVASÃO DAS CÉLULAS HUVEC ($2,5X10^3$ CÉLULAS/POÇO), EM CÂMARA DUPLA DE MATRIGEL (CONDIÇÃO I: HUVECS CULTIVADAS NO POÇO SUPERIOR E AS PLAQUETAS NO POÇO INFERIOR) E B) MIGRAÇÃO DAS CÉLULAS HUVEC ($5X10^4$ CÉLULAS/POÇO), AVALIADA PELA TÉCNICA DE SCRATCH, NA PRESENÇA DE PLAQUETAS ISOLADAS DE INDIVÍDUOS CONTROLE (AA) E PACIENTES COM DOENÇA FALCIFORME SC (SC). RESULTADOS EXPRESSOS COMO MÉDIA. **P<0,01, COMPARADO AO BASAL, DETERMINADO POR KRUSKAL WALLIS, SEGUIDO PELO DO TESTE DE DUNN. 77

FIGURA 27: ANÁLISE DO SECRETOMA DE FATORES PRÓ-ANGIOGÊNICO NO SOBRENADANTE DE PLAQUETAS ISOLADAS DE INDIVÍDUOS CONTROLES E PACIENTES COM DOENÇA FALCIFORME SC. CONCENTRAÇÕES DE: A) ANGIOPOITINA 1, B) ANGIOGENINCA, C) FATOR DE CRESCIMENTO DERIVADO DE FIBROBLASTOS, D) FATOR DE CRESCIMENTO PLACENTÁRIO, E) FATOR DE CRESCIMENTO DERIVADO DE PLAQUETAS AA E F) FATOR DE CRESCIMENTO VASCULAR, DETECTADAS NO SOBRENADANTE DE PLAQUETAS ISOLADAS ($5X10^4$ PLAQUETAS/POÇO) DE INDIVÍDUOS SAUDÁVEIS (AA) E PACIENTES COM DOENÇA FALCIFORME SC (SC) INCUBADAS POR 20 HORAS. RESULTADOS EXPRESSOS COMO MÉDIA. COMPARADO AO GRUPO CONTROLE AA, DETERMINADO POR TESTE DE MANN WHITNEY. 78

FIGURA 28: ANÁLISE DO SECRETOMA DE FATORES ANTI-ANGIOGÊNICOS NO SOBRENADANTE DE PLAQUETAS. CONCENTRAÇÕES DE A) ENDOSTATINA E B) TROMBOSPONDINA-2 NO SOBRENADANTE DE PLAQUETAS ISOLADAS ($5X10^4$ PLAQUETAS/POÇO) DE INDIVÍDUOS SAUDÁVEIS (AA) E PACIENTES COM DOENÇA FALCIFORME (SC) INCUBADAS POR 20 HORAS. RESULTADOS EXPRESSOS COMO MÉDIA. *P<0,05; COMPARADO AO GRUPO CONTROLE AA, DETERMINADO POR TESTE MANN WHITNEY..... 79

FIGURA 29: RESUMO ESQUEMÁTICO DAS CONCLUSÕES OBTIDAS NO ESTUDO. DADOS COMPARADOS AO GRUPO CONTROLE (AA). HBSS (ANEMIA FALCIFORME) E HBSC (DOENÇA FALCIFORME SC). 87

FIGURA 30: ANÁLISE DO PERFIL PRÓ-ANGIOGÊNICO DO SOBRENADANTE DA CO-CULTURA DE CÉLULAS HUVECS E PLAQUETAS, NA PRESENÇA DE INSERTS DE TRANSWELL. CONCENTRAÇÕES DE: A) ANGIOPOITINA 1, B) ANGIOGENINA , C) FATOR DE CRESCIMENTO DERIVADO DE FIBROBLASTOS (FGF ÁCIDO), D) FATOR DE CRESCIMENTO PLACENTÁRIO (PIGF), E) FATOR DE CRESCIMENTO DERIVADO DE PLAQUETAS (PDGF BB), F) FATOR DE CRESCIMENTO DERIVADO DE PLAQUETAS (PDGF AA), E G) FATOR DE CRESCIMENTO VASCULAR (VEGF), QUANTIFICADOS NO SOBRENADANTE DA CO-CULTURA DE CÉLULAS ENDOTELIAIS (HUVEC, $1x10^5$ CÉLULAS/ML) E PLAQUETAS ISOLADAS ($5x10^4$ PLAQUETAS/POÇO), DE INDIVÍDUOS SAUDÁVEIS (AA) E PACIENTES COM ANEMIA FALCIFORME (SS). AS HUVECS FORAM CO-CULTIVADAS COM AS PLAQUETAS (20H, 37°C). O GRUPO BASAL FOI CULTIVADO NAS MESMAS CONDIÇÕES (F12K 2% SFB). O GRUPO VEGF (10NG/ML) FOI USADO COMO CONTROLE POSITIVO. RESULTADOS EXPRESSOS COMO MÉDIA . RESULTADOS EXPRESSOS COMO MÉDIA. *P<0,05; COMPARADO AO BASAL, DETERMINADO POR KRUSKAL WALLIS, SEGUIDO PELO DO TESTE DE DUNN. 103

FIGURA 31: ANÁLISE DO PERFIL ANTI-ANGIOGÊNICO DO SOBRENADANTE DA CO-CULTURA DE CÉLULAS HUVECS E PLAQUETAS, NA PRESENÇA DE INSERTS DE TRANSWELL. CONCENTRAÇÕES DE A) ENDOSTATINA E B) TROMBOSPONDINA-2, QUANTIFICADOS NO SOBRENADANTE DA CO-CULTURA DE CÉLULAS ENDOTELIAIS (HUVEC, $1x10^5$ CÉLULAS/ML) E PLAQUETAS ISOLADAS ($5x10^4$ PLAQUETAS/POÇO), DE INDIVÍDUOS SAUDÁVEIS (AA) E PACIENTES COM ANEMIA FALCIFORME (SS). AS HUVECS FORAM CO-CULTIVADAS COM AS PLAQUETAS (20H, 37°C). O GRUPO BASAL FOI CULTIVADO NAS MESMAS CONDIÇÕES (F12K 2% SFB). O GRUPO VEGF (10NG/ML) FOI USADO COMO CONTROLE POSITIVO. RESULTADOS EXPRESSOS COMO MÉDIA. *P<0,05; COMPARADO AO BASAL, DETERMINADO POR KRUSKAL WALLIS, SEGUIDO PELO DO TESTE DE DUNN. 104

FIGURA 32:DESENHO EXPERIMENTAL USADO PARA O TRATAMENTO DOS ANIMAIS. 106

FIGURA 33: NEOVASCULARIZAÇÃO DO PLUG DE MATRIGEL EM CAMUNDONGOS C57BL/6J E ANIMAIS TOWNES. QUANTIFICAÇÕES DE HEMOGLOBINA EM PLUG DE MATRIGEL FORAM FEITOS PELO MÉTODO DE DRABKINS**.** HEMOGLOBINA LIVRE QUANTIFICADA EM PLUGS INOCULADOS EM CAMUNDONGOS CONTROLES (C57BL/6JUNIB) E FALCIFORME (TOWNES). RESULTADOS EXPRESSOS COMO MÉDIA E ERRO PADRÃO. ANTI-GPIB; ANTI-CD42B. 107

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: RESULTADOS OBTIDOS A PARTIR DA ANÁLISE DE MARCADORES POR CITOMETRIA DE FLUXO. 44
TABELA 2: COMPARAÇÃO DOS PARÂMETROS DEMOGRÁFICOS E HEMATIMÉTRICOS DE CONTROLES E PACIENTES COM ANEMIA FALCIFORME SS. 47
TABELA 3: COMPARAÇÃO DOS PARÂMETROS HEMATIMÉTRICOS DE CONTROLES E PACIENTES COM DOENÇA FALCIFORME SC. 70

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1: Principais proteínas armazenadas nos grânulos alfa de plaquetas, envolvidos no processo de angiogênese......28
QUADRO 2: Marcadores testados para a confirmação do fenótipo das células endoteliais.....35
QUADRO 3: Intervalos de detecção de cada fator quantificado através do kit comercial *Human Angiogenesis A Premixed Mag Luminex Performance Assay*.....38

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 24

1.1 DOENÇA FALCIFORME 24

1.2 FISIOPATOLOGIA DA DOENÇA FALCIFORME 24

1.3 PLAQUETAS E A DOENÇA FALCIFORME 26

1.3 PLAQUETAS E ANGIOGÊNSE 28

1.4 ANGIOGÊNESE E A DOENÇA FALCIFORME 31

1.5 TRATAMENTO 32

2. JUSTIFICATIVA 33

3. OBJETIVOS 34

3.1 OBJETIVOS GERAL: 34

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS: 34

4.METODOLOGIA 35

4.1 RECRUTAMENTO DOS PARTICIPANTES DO ESTUDO 35

4.2 HEMOGRAMA 35

4.3 SEPARAÇÃO DE PLAQUETAS. 35

4.4 SEPARAÇÃO DE PLASMA RICO EM PLAQUETAS (PRP). 36

4.5 CULTURA DE CÉLULAS ENDOTELIAIS DE CORDÃO UMBILICAL (HUVEC). 36

4.6 CITOMETRIA DE FLUXO: PLASMA RICO EM PLAQUETAS (PRP). 37

4.7 ENSAIO DE VIABILIDADE DAS CÉLULAS HUVEC. 38

4.8 AVALIAÇÃO DA FORMAÇÃO DE ESTRUTURAS TIPO CAPILARES PELAS CÉLULAS ENDOTELIAIS. 38

4.9 ENSAIOS DE PROLIFERAÇÃO CELULAR DE HUVEC 39

4.10 ENSAIO DE INVASÃO DE CÉLULAS HUVEC. 39

4.11 ENSAIO DE MIGRAÇÃO CELULAR DE HUVEC: TÉCNICA DE SCRATCH. 40

4.12 COLETA DO SOBRENADANTE DE CÉLULAS HUVEC E PLAQUETAS PARA ENSAIO MULTIPLEX. 41

5. ANÁLISE ESTATÍSTICA 43

6. RESULTADOS 44

6.1 CONFIRMAÇÃO DO FENÓTIPO DAS CÉLULAS ENDOTELIAIS USADAS EM CULTURA, POR CITOMETRIA DE FLUXO. 44

6.2 PACIENTES COM ANEMIA FALCIFORME HbSS (SS) 46

6.2.1 COMPARAÇÃO DOS PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS. 46

6.2.2 AVALIAÇÃO DA ATIVAÇÃO PLAQUETÁRIA EM PACIENTES COM ANEMIA FALCIFORME HbSS. 48

6.2.3 EFEITO DA PRESENÇA DAS PLAQUETAS DE PACIENTES COM ANEMIA FALCIFORME (HbSS) NA VIABILIDADE DAS CÉLULAS HUVEC. 50

6.2.4 AVALIAÇÃO DA FORMAÇÃO DE ESTRUTURAS TIPO CAPILARES PELAS CÉLULAS ENDOTELIAIS NA PRESENÇA DE PLAQUETAS ISOLADAS OU PRP. 52

6.2.5 AVALIAÇÃO DA PROLIFERAÇÃO CELULAR DAS HUVECS NA PRESENÇA DE PLAQUETAS 59

6.2.5 AVALIAÇÃO DA INVASÃO CELULAR DAS HUVEC NA PRESENÇA DE PLAQUETAS EM CÂMARA DUPLA COM MATRIGEL 59

6.2.6 AVALIAÇÃO DA MIGRAÇÃO DAS HUVEC NA PRESENÇA DE PLAQUETAS ISOLADAS, ATRAVÉS DA TÉCNICA DE SCRATCH. 61

6.2.7 AVALIAÇÃO DO PERFIL DE FATORES ANGIOGÊNICOS NO SOBRENADANTE DE PLAQUETAS. 63

2.2.8 AVALIAÇÃO DO PERFIL DE FATORES ANGIOGÊNICOS NO SOBRENADANTE DA CO-CULTURA DE PLAQUETAS E CÉLULAS ENDOTELIAIS (HUVEC). 66

6.3 PACIENTES COM DOENÇA FALCIFORME HbSC (SC) 70

6.3.1 COMPARAÇÃO DOS PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS. 70

6.3.3 AVALIAÇÃO DA FORMAÇÃO DE ESTRUTURAS TIPO CAPILARES PELAS CÉLULAS ENDOTELIAIS NA PRESENÇA DE PLAQUETAS ISOLADAS DE INDIVIDUOS HbSC. 74

6.3.4 EFEITO DAS PLAQUETAS DE PACIENTES COM DOENÇA FALCIFORME SC NA VIABILIDADE E PROLIFERAÇÃO DAS CÉLULAS HUVEC. 76

6.3.5 AVALIAÇÃO DA INVASÃO E DA MIGRAÇÃO CELULAR DAS HUVECS NA PRESENÇA DE PLAQUETAS DE PACIENTES COM DOENÇA HbSC. 76

6.3.6 AVALIAÇÃO DO PERFIL ANGIOGÊNICO DO SOBRENADANTE DE PLAQUETAS DE PACIENTES COM DOENÇA FALCIFORME HbSC. 77

7. DISCUSSÃO 80

8.CONCLUSÃO 86

9.REFERÊNCIAS 88

10. ANEXOS 102

10.1 AVALIAÇÃO DO PERFIL ANGIOGÊNICO DO SOBRENADANTE DA CO-CULTURA DE PLAQUETAS E CÉLULAS ENDOTELIAIS (HUVEC) NA PRESENÇA DE *INSERTS* DE *TRANSWELL.* 102

10.2 AVALIAÇÂO do PAPEL DAS PLAQUETAS NA ANGIOGENESE DE CAMUNDONGOS TRANSGENICOS COM DOENÇA FALCIFORME 104

10.2.1 QUANTIFICAÇÃO DE HEMOGLOBINA LIVRE 104

1. INTRODUÇÃO

1.1 DOENÇA FALCIFORME

O termo doença falciforme (DF) engloba um grupo de doenças hereditárias, nas quais ocorre uma mutação genética no gene da cadeia da β-globina, que resulta na formação de uma hemoglobina anômala conhecida como hemoglobina S (HbS). Em homozigose, essa mutação causa a anemia falciforme (AF, HbSS), mas a herança em heterozigose com outras alterações da β-globina pode gerar outras doenças falciformes, como por exemplo, a doença falciforme SC (HbSC) e a HbS/β-talassemia (1-3). Estima-se que 4% da população brasileira possuam o traço falciforme (HbAS, heterozigose) e o número de indivíduos com a doença falciforme (homozigose), corresponda a um número aproximado entre 25 mil a 50 mil (4). A fisiopatologia da DF é complexa e envolve vários processos e tipos celulares. Pacientes com DF são mais suscetíveis a hipertensão pulmonar, acidente vascular cerebral (AVC), síndrome torácica aguda, danos a órgãos, crises de dor, internações frequentes e diminuição da expectativa de vida (5-6). De maneira geral, pacientes HbSS apresentam um quadro clínico mais grave, em relação às demais DF, contudo, pacientes HbSC são mais suscetíveis a retinopatia, complicações trombóticas, osteonecrose e necrose renal (8).

1.2 FISIOPATOLOGIA DA DOENÇA FALCIFORME

A mutação de ponto (c.20A>T) no gene que codifica a cadeia β-globina (*HBB*), que resulta na troca do aminoácido ácido glutâmico pelo aminoácido valina, leva à produção da HbS e resulta na modificação das propriedades físico-químicas das hemácias, tornando-as mais rígidas e frágeis (1). A HbS naturalmente possui uma menor afinidade pelo oxigênio, em comparação a hemoglobina normal (HbA), e em situações de baixa oxigenação, a HbS forma tetrâmeros e sofre polimerização, fazendo com que a hemácia assuma um formato alongado, como de uma foice, em um evento conhecido como falcização (3). Os eventos frequentes de polimerização da HbS, juntamente com a desidratação e as lesões oxidativas da membrana das hemácias, resultam em alterações do citoesqueleto, os quais alteram a conformação das hemácias para um aspecto irreversível de foice, diminuindo assim a sobrevida dessas células (9-11). As hemácias falcizadas expressam várias moléculas de adesão em sua superfície, como por exemplo, α4β1, Lu/BCAM, LFA-3 e ICAM-4, que favorecem a adesão

destas células ao endotélio vascular e a formação de agregados heterocelulares com plaquetas, outras hemácias e leucócitos. A formação desses agregados colabora para a diminuição do fluxo sanguíneo, podendo levar a vaso-oclusões, principalmente, na microcirculação (12-14). A falcização das hemácias e a vaso-oclusão são os principais eventos fisiopatológicos que caracterizam a DF.

As hemácias de pacientes com DF apresentam um aumento da exposição de fosfatilserina, e, por isso, estes pacientes passam também a sofrer as consequências de uma doença hemolítica, com episódios frequentes de hemólise extra e intravascular. A hemólise intravascular desempenha um papel importante na fisiopatologia da DF (15-17). A liberação da hemoglobina livre (HbL) no plasma causa o sequestro de óxido nítrico (NO) do vaso e contribui para a vasoconstrição e o retardamento do fluxo sanguíneo (18). A diminuição de NO e a liberação de espécies reativas de oxigênio (ROS) durante os eventos hemolíticos e vaso-oclusivos resultam no aumento da ativação endotelial e plaquetária (3). O grupo heme ferroso, liberado da hemoglobina, e a presença de *DAMPS (Damage-associated molecular patterns),* como por exemplo o ATP, contribuem para a ativação do sistema imune inato (15; 19-20). A ativação dos receptores *toll-like* (TLR) estimula macrófagos e monócitos, os quais liberam citocinas pró-inflamatórias que promovem a ativação de células endoteliais, plaquetas e leucócitos. Armadilhas extracelulares de neutrófilos (NET), liberadas por neutrófilos ativados, contribuem para a formação de inflamassomas e favorecem a manutenção de um processo inflamatório crônico nestes pacientes (21-27). A inflamação vascular na DF contribui para a propagação do processo vaso-oclusivo (28), resultando em dor e lesões permanentes a tecidos e órgãos (Figura 1).

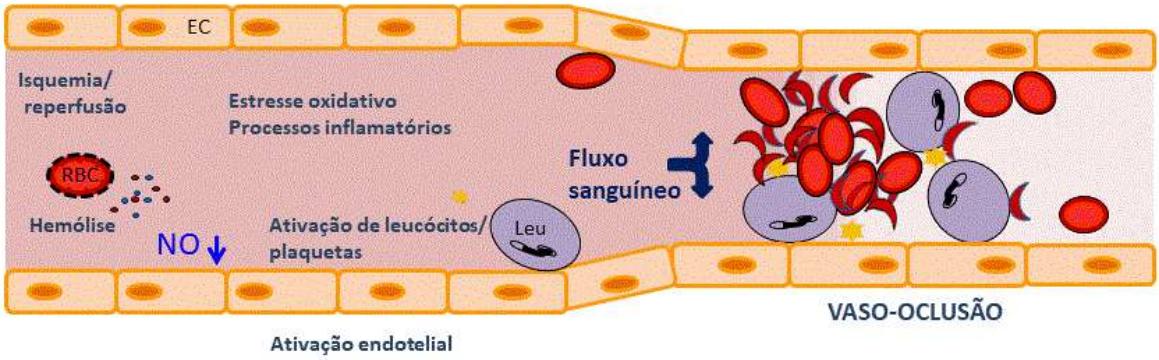

Figura 1: Processo vaso-oclusivo na anemia falciforme. A liberação de hemoglobina livre e heme na circulação diminui a biodisponibilidade de óxido nítrico (NO), causando vasoconstrição e induzindo a liberação de espécies reativas de oxigênio. A ativação do endotélio resulta na adesão de vários tipos celulares, como hemácias (RBC) e leucócitos, além de plaquetas ativadas. A vasoconstrição e a obstrução física do vaso, devido ao recrutamento celular e a formação de agregados heterocelulares, ocasionam redução no fluxo sanguíneo, hipóxia e a consequente falcização das hemácias, dificultando a passagem do sangue e, finalmente, resultando na vaso-oclusão. Adaptado de Mendonça et al. (19).

A cada ano, fica mais evidente que plaquetas desempenhem um papel importante na inflamação vascular e no processo vaso-oclusivo na DF (29-32). Já é conhecido, que elas podem contribuir para algumas das complicações da doença, como o AVC isquêmico e o tromboembolismo venoso (33-34).

1.3 PLAQUETAS E A DOENÇA FALCIFORME

As plaquetas não possuem núcleo e são derivadas de megacariócitos da medula óssea. São compostas por microtúbulos, mitocôndrias, lisossomos e grânulos citoplasmáticos do tipo denso e do tipo alfa (35). Sua pequena estrutura colabora para que sejam capazes de responder imediatamente a pequenos estímulos do microambiente (citocinas, mudanças na viscosidade do sangue, entre outros). Há evidencias de que elas participam ativamente como células do sistema imune (36-37). A rápida resposta se dá pela presença de numerosas glicoproteínas e receptores em sua membrana (38-39). As plaquetas desempenham um papel importante no sistema homeostático, sendo capazes de iniciar a formação de um tampão sobre a superfície lesionada, diminuindo assim a perda sanguínea (38). Sob condições fisiológicas normais, as plaquetas possuem formato discoide, entretanto, após a sua ativação, elas assumem novos formatos, podendo liberar conteúdo de seus grânulos e micropartículas para o meio extracelular (39).

Os grânulos do tipo denso armazenam fatores que potencializam a ativação plaquetária, como por exemplo, adenosina difosfato (ADP), adenosina trifosfato (ATP), cálcio, serotonina, histamina e dopamina, já os grânulos alfas armazenam fatores envolvidos na coagulação, angiogênese, adesão celular e inflamação (40). As plaquetas ativadas são capazes de aderir às células endoteliais através da interação do complexo receptor da glicoproteína (GP) com o fator de Von Willebrand e o colágeno da matriz extracelular (39). A integrina αIIbβ3, em estado ativado, favorece a agregação plaquetária (39;41). Os receptores de trombina da família PAR (*Protease-activated receptor*) pertencem a superfamília de receptores acoplados da proteína G e medeiam a maior parte das respostas da trombina em plaquetas humanas, atuando diretamente na agregação e ativação das plaquetas (41). As plaquetas auxiliam na coordenação das respostas inflamatórias (42); por exemplo, a liberação de mediadores pró-inflamatórios (43-44), como o ligante CD40L e o fator plaquetário do tipo 4 (45-46), provocam respostas mediadas por neutrófilos, monócitos, linfócitos T (47).

Várias das proteínas pró-inflamatórias liberadas a partir de plaquetas ativadas estão aumentadas na DF, incluindo o ligante de CD40L, a proteína TNFSF14 e a interleucina 1-beta (48-51). Pacientes com DF também apresentam contagem elevada de plaquetas (52-53), com aumento expressivo da ativação plaquetária (54). Há indícios de que a circulação e a agregação das plaquetas de pacientes com DF sejam anormais, mesmo durante os quadros de estabilidade clínica e na ausência de crises de vaso-oclusão (34;55). O mecanismo pelo qual isso ocorre, no entanto, ainda é pouco conhecido. Sabe-se que a ADP liberada a partir da destruição das hemácias na circulação de pacientes com DF pode contribuir para a ativação plaquetária, assim como a expressão de fosfodilserina na superfície das hemácias, a diminuição da biodisponibilidade de NO e as concentrações elevadas de trombina na circulação desses pacientes (56-57). As plaquetas de indivíduos falciformes também possuem uma capacidade maior de aderirem ao ligante fibronectina, provavelmente devido ao aumento na atividade da integrina αIIbβ3 e da expressão de P-selectina e à redução da sinalização dependente do nucleotídeo adenosina monofosfato cíclica (58). Estudos recentes mostraram indícios da formação de inflamassoma do tipo NLRP3 em plaquetas de pacientes com DF, o que pode colaborar para a ativação e consequente agregação das plaquetas nesses pacientes (59-62). Ainda, nosso grupo recentemente mostrou que a adesão das plaquetas ao endotélio danificado pode mediar a adesão de outras células, como os neutrófilos, a esse endotélio (33).

1.3 PLAQUETAS E ANGIOGÊNSE

Além do papel importante desempenhado pelas plaquetas no processo inflamatório e da sua contribuição para a vaso-oclusão na DF, há indícios de que as plaquetas atuem como reservatórios de fatores envolvidos na angiogênese (63-66). A angiogênese é o processo em que ocorre a formação de novos vasos a partir de vasos pré-existentes. É um processo complexo, envolvendo várias etapas e estímulos (67-68), diretamente influenciado pelas condições físico-químicas do microambiente vascular, interações células-células, secreção de citocinas e moléculas de adesão (69).

A formação de novos vasos, após a embriogênese, desempenha um papel importante na cicatrização de feridas e na fisiologia de algumas doenças inflamatórias, vasculares e neoplásicas, podendo ser benéfico ou prejudicial, dependendo do contexto em que ele ocorre (70-72). As células endoteliais desempenham um papel importante no processo angiogênico, pois atuam no remodelamento e na manutenção do tônus vascular, na fluidez do sangue, na coagulação e na troca de nutrientes. Os pericitos são células contráteis que também desempenham um papel importante nesse processo e atuam regulando o calibre do vaso e o fluxo sanguíneo (70). Várias proteínas liberadas a partir de diferentes tipos celulares e estímulos do microambiente (73-77) atuam na angiogênese (Quadro 1).

Quadro 1: Principais proteínas armazenadas nos grânulos alfa de plaquetas, envolvidas no processo de angiogênese. Adaptado de Martinez *et al.* (78).

FATOR ANGIOGÊNICO	FUNÇÕES	CÉLULAS PRODUTORAS	REFERÊNCIAS
Fator de crescimento vascular endotelial (VEGF)	Controle da proliferação, morfogênese, migração e sobrevivência das células endoteliais.	Célula endotelial, queratinócitos, mastócitos, macrófagos, fibroblastos, pericitos, entre outros.	79
Fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF).	Atua na maturação dos vasos e recrutamento de células progenitoras endoteliais da medula óssea.	Plaquetas, células endoteliais, células musculares, macrófagos, entre outro.	80
Fator de crescimento de fibroblastos (FGF)	Formação de túbulos vascular. Estimula a secreção de VEGF.	Fibroblastos, células vasculares, células endoteliais, musculares e outros.	81
Angiopoitinas (Ang)	Estimula a maturação dos novos vasos e induz a quimiotaxia de pericitos.	Pericitos, células endoteliais	82
Fator de crescimento placentário (PIGF)	Induz migração de células endoteliais, atua na permeabilidade vascular, forma heterodímeros com VEGF.	Células da placenta.	79
Angiogenina	Estimula a proliferação e a migração celular.	Vários tipos celulares, entre elas a célula endotelial	83
Trombospondina	Inibe a migração de células endoteliais e promove a apoptose celular.	Fibroblastos, células vasculares, entre outras.	84

Em situações de baixa oxigenação sanguínea, ocorre o aumento da expressão do gene *HIF-1* (*Hypoxia Inducible Factor*), o que resulta no aumento da transcrição do gene

VEGF e outros fatores pró-angiogênicos em diferentes tipos celulares (73). A proteína VEGF difunde-se, então, através dos tecidos (Figura 2), ativando as células endoteliais próximas ao local e estimulando a proliferação e migração celular. Concomitante a isso, metaloproteinases promovem o remodelamento da matriz extracelular. Esses eventos resultam no surgimento de um novo broto vascular, que se desenvolve em direção a outro broto pré-existente, até que ocorra a anastomose tubular (85-86). Outros fatores, como a angiopoitina 1 (ANG-1) e o fator de crescimento derivado de plaquetas B (PDGF-B), induzem a quimiotaxia de pericitos, tornando os capilares formados mais estáveis e prontos para receber o fluxo sanguíneo (83).

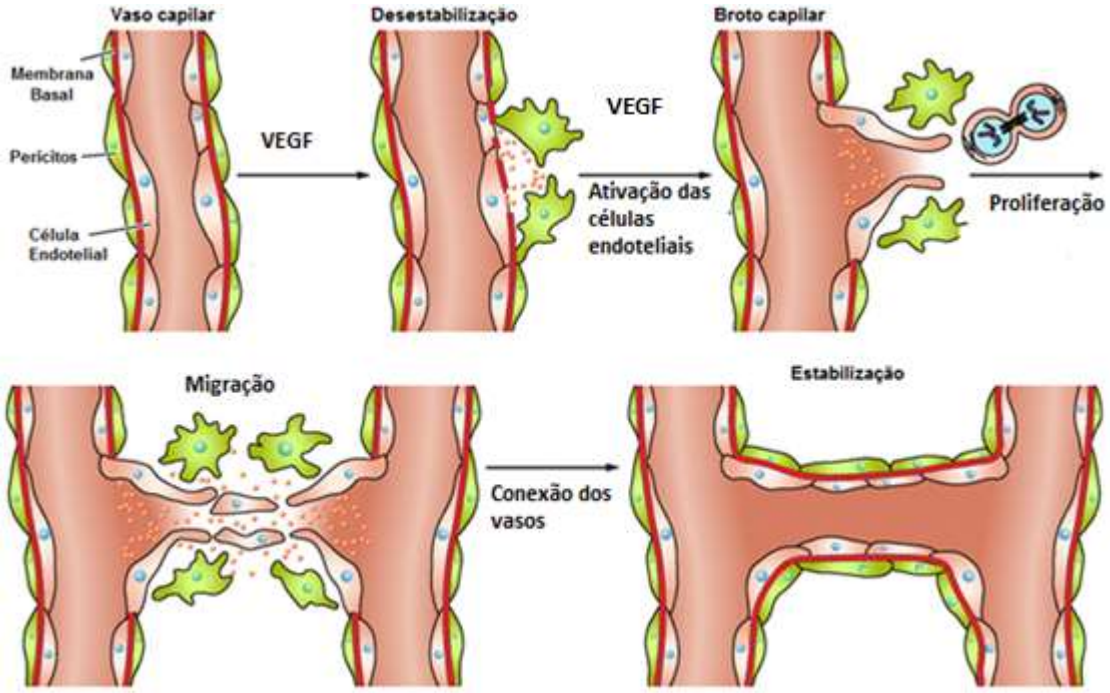

Figura 2: Principais eventos envolvidos no processo de angiogênese. Fatores angiogênicos, como o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), se ligam a receptores específicos nas células endoteliais (CE) adjacentes, ativando-as. Então, iniciam-se a proliferação e a migração de CE até o local do tecido doente e, conforme os vasos sanguíneos se estendem, o tecido é remodelado ao redor do vaso. As CE em desenvolvimento migram para formar um novo vaso sanguíneo, e vasos sanguíneos individuais se conectam, formando um circuito por onde o sangue pode circular. Adaptado de Clapp et al. (86).

Pouco ainda é conhecido sobre o papel que as plaquetas desempenham nesse processo, contudo, já foi descrito que, em resposta a diferentes estímulos do microambiente, elas podem agir como estimuladoras ou inibidoras desse processo (87). Entretanto, já é bem estabelecido que as plaquetas armazenam no interior de seus grânulos alfa vários fatores envolvidos na angiogênese (63-66; 78). Estudos anteriores indicam que possam existir, pelo

menos, duas subpopulações de grânulos alfa nas plaquetas, as quais armazenam fatores angiogênicos distintos. Segundo estes autores, a estimulação do receptor de trombina PAR-1 em plaquetas poderia resultar na liberação de fatores promotores da angiogênese, como por exemplo o VEGF, enquanto a estimulação do receptor de trombina PAR-4 levaria a liberação de fatores anti-angiogênicos, como a endostatina (88-89). Também há relatos de que a ADP e o tromboxano A_2 atuem na estimulação da liberação diferencial de fatores angiogênicos (90). No entanto, esse tema ainda é motivo de debate no meio científico (91-92). Estudos realizados nos últimos anos, usando ensaios *in vitro*, ofereceram indícios de que as plaquetas de indivíduos saudáveis e pacientes diabéticos podem aumentar a formação de estruturas do tipo capilares, quando incubadas com células endoteliais formadoras de colônia (93) e que os conteúdos provenientes dos grânulos alfa de plaquetas podem aumentar a formação de estruturas capilares em células HUVECs (94-95).

Há indícios na literatura de que o processo angiogênico contribua para o desenvolvimento de algumas das complicações da DF, entre elas retinopatia proliferativa, hipertensão pulmonar, úlceras de perna e síndrome de Moyamoya (96-98).

1.4 ANGIOGÊNESE E A DOENÇA FALCIFORME

Na DF, a hipóxia está diretamente relacionada com a fisiopatologia da doença. Pacientes com DF, de modo geral, apresentam concentrações elevadas de vários fatores angiogênicos, entre eles PIGF (96), VEGF, angiopoietina-2 (99-100), angiopoietina 1 (99,101), angiopoitina 2 (102), trombospondina (103) e do fator derivado do estroma da medula óssea (SDF-1), um mediador importante da angiogênese e inflamação. Um estudo do nosso grupo de pesquisa demonstrou, *in vitro*, que o plasma de indivíduos DF apresenta um perfil plasmático pró-angiogênico e que este perfil é diferente em pacientes HbSS e pacientes HbSC. Foram encontradas concentrações plasmáticas elevadas dos fatores estimuladores da angiogênese, ANG 1, FGF, VEGF e PlGF, no grupo de pacientes HbSS, enquanto as concentrações dos fatores pró-angiogênicos PIGF, VEGF e dos fatores anti-angiogênicos, endostatina e trombospondina, foram mais elevadas no grupo de pacientes HbSC (103). Também, mostramos que a hidroxiuréia (HU), principal droga utilizada no tratamento da doença falciforme, pode atuar como droga inibidora da angiogênese, diminuindo a expressão gênica de HIF-1,

inibindo a proliferação de células endoteliais e a formação de estruturas capilares *in vitro, e* impedindo o processo de neovascularização *in vivo* (104).

Em 2018, Antwi-Boasiako e colaboradores, compararam as concentrações plasmáticas de ANG 1, ANG 2 e VEGF de pacientes com AF em estado estacionário (sem complicações) e pacientes com AF com histórico de crise vaso-oclusiva recente, úlceras de perna e priaspismo. O estudo mostrou que as concentrações de ANG-1, ANG-2 e VEGF estavam significantemente mais elevadas no plasma dos pacientes com complicações, em comparação aos pacientes em estado estacionário (105). Um estudo recente mostrou que a disfunção vascular, em consequência do processo inflamatório, somada ao perfil pró-angiogênico da DF, contribui para a angiogênese desregulada e patológica da doença (106).

1.5 TRATAMENTO

O transplante de medula óssea alogênico é o único método capaz, neste momento, de curar a AF, mas somente uma pequena porcentagem dos pacientes consegue encontrar um doador compatível. O uso de medicações que possam diminuir as complicações da doença, portanto, faz a diferença na vida dos pacientes (107-108). Não existem muitas opções farmacológicas aprovadas pela FDA (*Food and Drug Administration*) para o tratamento da DF, e a hidroxiureia (HU) continua sendo a principal droga utilizada. A HU é um agente citostático capaz de modificar a evolução da doença, melhorar os parâmetros hematológicos e diminuir significativamente as hospitalizações dos pacientes (30). Ela atua principalmente aumentando as concentrações de hemoglobina fetal nas hemácias, o que favorece a diminuição da polimerização da HbS (109-110). Recentemente, o uso de L-glutamina, Crizanlizumab e Voxelotor foi aprovado pela FDA para tratamento da DF, mas evidências dos benefícios destes medicamentos isolados, em termos de uma melhoria na qualidade de vida e sobrevivência de pacientes com AF, ainda estão incipientes (111-112).

2. JUSTIFICATIVA

Embora alguns estudos venham contribuindo para o entendimento inicial da angiogênese e de um possível papel das plaquetas nesse contexto, ainda se sabe muito pouco sobre o comportamento das plaquetas de pacientes com DF no processo de angiogênese. Das numerosas complicações clínicas da DF, algumas podem ser associadas a desequilíbrios no processo angiogênico e às mudanças nas concentrações de fatores pró-angiogênicos plasmáticos (103). Estudos do nosso grupo (e outros) de pesquisa mostraram que pacientes portadores de DF apresentam maior ativação plaquetária (54-55) e que as plaquetas destes indivíduos secretam fatores pró-inflamatórios em maior quantidade (48-51). Estudos que busquem entender e explorar as possíveis contribuições das plaquetas de pacientes com doença falciforme na angiogênese poderão contribuir para avanços na pesquisa terapêutica e diminuição das complicações da doença.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVOS GERAL:

Avaliar a influência das plaquetas de pacientes com doença falciforme nos principais mecanismos angiogênicos das células endoteliais, *in vitro*.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

I. Avaliar a influência *in vitro* das plaquetas de indivíduos controles e pacientes com DF na formação de estruturas do tipo capilar por células endoteliais (HUVEC).

II. Avaliar a influência das plaquetas de indivíduos controles e pacientes com DF nos mecanismos angiogênicos (proliferação, migração e invasão) de células endoteliais (HUVEC), *in vitro.*

III. Caracterizar o perfil de liberação de fatores pró-angiogênicos e anti-angiogênicos armazenados e secretados por plaquetas de pacientes com DF (HbSS e HbSC).

IV. Avaliar a relação entre a ativação plaquetária e a estimulação (ou não) de mecanismos angiogênicos das células endoteliais (HUVEC), *in vitro*.

4.METODOLOGIA

4.1 RECRUTAMENTO DOS PARTICIPANTES DO ESTUDO

Foram recrutados pacientes do ambulatório do Centro de Hematologia e Hemoterapia da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), com diagnóstico confirmado de DF que atendiam os seguintes critérios:

I. Pacientes com DF, homozigotos para HbS (HbSS), em estado estável, sem histórico clínico de retinopatia proliferativa e, sob uso ou não, de 15-30 mg/kg/dia de HU. Atualmente, a maioria dos pacientes atendidos no ambulatório do Hemocentro da Unicamp, fazem uso de HU.
II. Pacientes com DF, duplo-heterozigotos para HbS e HbC (HbSC);
III. Indivíduos saudáveis (HbAA; doadores de sangue, alunos e funcionários da UNICAMP).

Foram excluídos do estudo: 1) pacientes que haviam recebido transfusão sanguínea e/ou que apresentaram episódios de dor nos últimos três meses; 2) pacientes oucontroles sem DF que haviam feito uso de anticoagulantes nos últimos dez dias.

Todos os indivíduos que participaram deste estudo assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), previamente aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP (CAAE: 65253516100005404).

4.2 HEMOGRAMA

Os hemogramas foram realizados durante os exames de rotina, utilizando-se o Sistema de Hematologia 120 Advia (*Bayer Diagnostics, Tarrytown,* NY, EUA), no dia da coleta das amostras. Outros dados, como idade, porcentagem de hemoglobina fetal, medicamentos em uso e complicações clínicas foram obtidos dos prontuários médicos.

4.3 SEPARAÇÃO DE PLAQUETAS.

As amostras de plaquetas isoladas, de pacientes e controles, foram obtidas a partir de amostras de sangue periférico coletadas em tubo contendo o anticoagulante citrato de sódio (3,2%), com ácido cítrico-dextrose (ACD). Após centrifugação (200 x *g, 20min,* 21ºC), o plasma rico em plaquetas (PRP) foi coletado (aproximadamente 5 ml) e transferido para um tubo de 15 mL. Posteriormente, foram adicionados 7 ml do tampão de lavagem (NaCl 140 mM / KCl 0,5 mM / citrato de sódio 12 mM / glicose 10 mM / sacarose 12,5 mM, pH=6)

e realizada uma nova centrifugação (800 x *g, 12min,* 21ºC). O sobrenadante foi, então, descartado, e o *pellet* de plaquetas ressuspendido delicadamente (para evitar ativação plaquetária) em 1 mL de solução de Krebs. Todas as etapas foram feitas dentro do fluxo laminar, com procedimentos e técnicas estéreis. Para o cálculo do número de plaquetas, foi utilizado o equipamento *Beckman Coulter* (*Fullerton, CA, EUA).* Após a contagem das plaquetas, a concentração foi ajustada para $1x10^6$ plaquetas/ml. As plaquetas foram ressuspendidas em meio de cultura F12K, suplementado com 2% de soro fetal bovino.

4.4 SEPARAÇÃO DE PLASMA RICO EM PLAQUETAS (PRP).

Amostras de sangue periférico (7 mL), de pacientes e controles, foram coletadas em tubos contendo o anticoagulante citrato de sódio (3,2%). Após centrifugação (200 x *g, 15min*, 21ºC), o plasma rico em plaquetas (PRP) foi transferido para um tubo de 15 ml. Para o cálculo do número de plaquetas, foi utilizado o equipamento *Ac-T diff Analyser,Beckman Coulter (Fullerton, CA, EUA).* Após a contagem,a concentração das plaquetas em suspensão foi ajustada para $1x10^6$ plaquetas/ml em meio de cultura F12K, suplementado com 2% de soro fetal bovino (cultura celular) ou solução de Krebs (citometria). Todas as etapas foram feitas dentro do fluxo laminar, com procedimentos e técnicas estéreis.

4.5 CULTURA DE CÉLULAS ENDOTELIAIS DE CORDÃO UMBILICAL (HUVEC).

Foram utilizadas células endoteliais de veia de cordão umbilical humano (HUVEC), adquiridas do banco de células americano ATCC (*The Global Bioresource Center*), ATCC (R) F-14349 1730-CRL (cód. 023028), nas passagens de 14 a 22. As células foram cultivadas em meio de cultura F12-K (invitrogen), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB, Invitrogen), fator de crescimento *Endothelial Cell Growth Supplement Bovine Neural Tissue* (sigma, 30 ng/ml), heparina líquida (10 U/ml) e antibióticos streptomicina (10000 μg/ml) e penicilina (10000 U/ml), em garrafas de 75 cm^2à 37ºC com 5% de CO_2. Após atingirem a confluência desejada (aproximadamente 90%), as células foram repicadas (Tripsina 0,25% e EDTA 0,53mM) e distribuídas em novas garrafas, para aumentar a proliferação celular. Para isso, o meio de cultura foi descartado, e as células aderidas à garrafa foram lavadas com solução de PBS para retirar o excesso de meio de cultura e SFB. Cerca de 3 ml da solução de Tripsina foram adicionados por garrafa por 4 min (37ºC, 5% CO_2).

Após o desprendimento total das células, a tripsina foi neutralizada pela adição de 3 ml de SFB por garrafa. Posteriormente, o sobrenadante foi coletado e 5 ml de PBS foram adicionados para lavagem das células. O conteúdo foi centrifugado (130 x *g*, 7 min, 24°C) e, após o descarte do sobrenadante, o *pellet* de células foi ressuspendido em meio de cultura F12 K suplementado. Toda vez que as células foram repicadas, foi contabilizada uma nova passagem. Antes de todo experimento, a concentração de SFB no meio de cultura F12-K foi reduzido a 2%. O fenótipo celular foi confirmado por citometria do fluxo (Quadro 2).

Quadro 2: Marcadores testados para a confirmação do fenótipo das células endoteliais.

ANTICORPO	FLUORO-CRÔMO	CLONE	MARCADOR
Mouse anti human CD45	PerCP	2D1	Leucócito
Mouse Anti-Human CD133/1	APC	AC133	Célula-tronco hematopoiética
Mouse Anti-Human CD31	FITC	MBC 78.2	Molécula de adesão celular endotelial plaquetária
Mouse Anti-Human CD146	PE	P1H12	Molécula de adesão celular de melanoma
Mouse Anti Human CD34	FITC	8G12	Células hematopoiéticas
Mouse Anti-Human CD144	PE	TEA1/31	Caderina vascular (células endoteliais).
Mouse Anti-Human CD105	PE	SN6	Endotélio Vascular

4.6 CITOMETRIA DE FLUXO: PLASMA RICO EM PLAQUETAS (PRP).

As expressões das proteínas P-selectina (CD62P), PAR-1, PAR-4 e integrina αiibβ3 (CD41a/CD61) foram avaliadas nas superfícies das plaquetas por citometria de fluxo, utilizando os anticorpos humanos CD62P_PE (clone Psel.KO2.3, eBioscience^{TM}), PAR-1_Alexa Fluor 488 (R&D Systems), PAR-4_FITC (Alomone Labs), CD41a_ FITC (clone HIP8, eBioscience^{TM}) e CD41/CD61 alexa Fluor 647 (PAC-1, Biolegend). Para isso, amostras de PRP, ($1x10^6$ plaquetas) foram ressuspendidas em 200 µL de solução de Krebs e as

células foram então incubadas com os anticorpos mencionados (5µl) e analisadas no equipamento *FACScalibur* (*Becton-Dickinson, San Jose*, CA, USA). Foram obtidos cerca de 10.000 eventos para cada amostra. Para análise, foram criados *dotplots* SSC/FSC (*side scatter/forward scatter*), para identificação das plaquetas, e os resultados obtidos para a marcação de cada antígeno na superfície das plaquetas foram expressos em média de intensidade de fluorescência (MIF) e porcentagem de expressão.

4.7 ENSAIO DE VIABILIDADE DAS CÉLULAS HUVEC.

Os ensaios de viabilidade foram realizados utilizando-se a técnica de MTS (tetrazolion), através do Kit colorimétrico "*CellTiter 96® AQ$_{ueous}$ One Solution Cell Proliferation Assay*" (Promega). Em uma placa de 96 poços, células HUVEC foram cultivadas por 24 horas (1x 10^4 células/poço; 100 µL). Após este período, as amostras de plaquetas foram adicionadas (1×10^5 plaquetas/poço; 1×10^6 plaquetas/poço e 1×10^7 plaquetas/poço; 100 µL). Após 24 horas, foram adicionados, a cada poço, 20 µL do reagente MTS (tetrazólio [3- (4,5-dimetil-2-il) -5- (3-carboximetoxifenil) -2- (4-sulfofenil) -2H-tetrazólio). A placa foi incubada por 3 horas (37ºC, 5% CO_2). Após esse período, os cristais de formazana, formados a partir das mitocôndrias de células viáveis, geraram uma coloração amarronzada. A leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro *Versamax microplate reader* (*Molecular Devices*) em comprimento de onda de 490nm. Como controle positivo dos experimentos, as células HUVECs foram cultivadas em solução de PBS, no lugar de meio de cultura, por 24 horas, nas mesmas condições que as demais células usadas no estudo.

4.8 AVALIAÇÃO DA FORMAÇÃO DE ESTRUTURAS TIPO CAPILARES PELAS CÉLULAS ENDOTELIAIS.

Foram utilizadas células HUVEC para avaliar o efeito das plaquetas na formação de estruturas capilares. A matriz *GFR-Matrigel* (BD Biosciences) foi descongelada a 4ºC "overnight" e as pipetas, placas e tubos necessários para a realização da técnica foram previamente resfriados. Foram adicionados 50 µL de Matrigel em placas de 96 poços em gelo. Posteriormente, as placas foram colocadas na estufa a 37ºC durante 30 minutos para o gel polimerizar. As células HUVEC foram então contadas utilizando-se azul de Tripan em câmara de Neubauer e, em seguida, colocadas nas placas cobertas com Matrigel na concentração de 5×10^4 células/mL em meio (100 µL) com as respectivas amostras de plaquetas (1x10^5

plaquetas/poço,1×10^6 plaquetas/poço e 1×10^7 plaquetas/poço;100 µL). Após 20 horas, o número de estruturas capilares formadas em cada poço foi avaliado em microscópio invertido (40x, equipamento *Zeiss Axiovert* S100) de contraste de fase com câmera acoplada (Moticam 2500). Foram tiradas 5 fotos de cada poço. Posteriormente, utilizamos o mesmo experimento com plasma rico em plaquetas (PRP), para esse ensaio, entretanto, usamos apenas a concentração de $1x10^5$ plaquetas/poço.

Foram considerados como sendo estruturas capilares: ramos unidos por 2 pontos de ramificações; pontos de ramificações, extremidades que se ramificam em um ou mais ramos; nós, extremidades em que se conectam dois ou mais ramos; malhas de capilares, o circuito fechado de ramos e segmentos isolados, os pontos que não formam ramos. As estruturas formadas foram quantificadas com o auxílio do software *ImageJ_Angiogenesis Analyzer*.

4.9 ENSAIOS DE PROLIFERAÇÃO CELULAR DE HUVEC

A proliferação celular foi avaliada através da incorporação de BrdU no DNA das células endoteliais, co-cultivadas ou não com plaquetas isoladas. A quantificação das células em proliferação foi realizada utilizando-se o kit *Cell Proliferation ELISA, BrdU-colorimetric* (Roche) de acordo com as instruções do fabricante. Para isso, as células HUVEC (1×10^3 células/poço; 100µl), previamente cultivadas em placas de 96 poços, foram incubadas com as amostras de plaquetas (1×10^5 células/poço; 100µl) e BrdU. Após 24 horas, o meio de cultura foi removido, as células foram fixadas e o DNA desnaturado. Neste teste, o anti-BrdU-POD se liga ao BrdU incorporado e o complexo imune formado é detectado pela reação com o substrato. O produto da reação foi quantificado medindo-se a absorbância em um leitor de *Elisa Versamax microplate reader* (Molecular Devices) a 370nm com filtro de referência de 492nm.

4.10 ENSAIO DE INVASÃO DE CÉLULAS HUVEC.

Os ensaios de invasão foram realizados em câmara dupla, utilizando-se Matrigel (BD "*Biocoat Matrigel Invasion Chamber*"). Para avaliar a capacidade de as plaquetas estimularem a invasão das células endoteliais, células HUVEC ($5x10^3$ células/poço; 500 µl) fo-

ram semeadas em "*inserts"* (poço superior) em duas condições: I) células HUVECs e plaquetas isoladas ou PRP ($1x10^5$ plaquetas/poço; 500 µl), ambas em contato e dividindo o mesmo poço; e II) células HUVECs no poço superior, e plaquetas no poço inferior, como mostra a figura 3. As culturas foram colocadas na estufa a 37ºC durante 20 horas. Após lavagem com PBS (pH 7,4), as células que estavam no poço superior e migraram através da membrana de matrigel, que separa as duas câmaras (superior e inferior), foram fixadas com metanol a -20ºC e os seus núcleos corados com DAPI. Posteriormente as células foram visualizadas e quantificadas em microscópio de fluorescência (40x, equipamento *Zeiss Axiovert* S100) de contraste de fase com câmera acoplada (Moticam 2500).

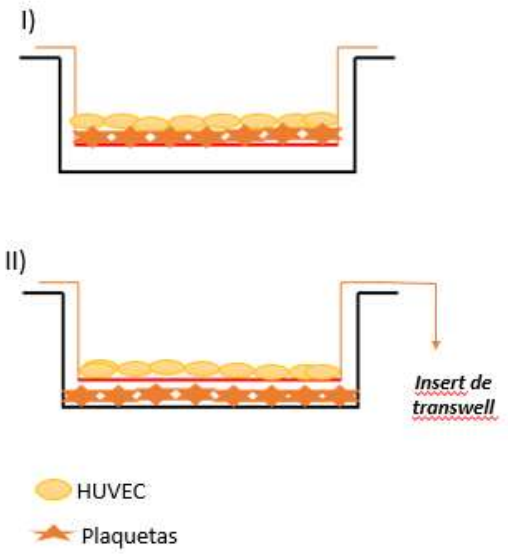

Figura 3:Ilustração das condições de cultivo celular usadas para os ensaios de invasão celular em câmara dupla de Matrigel. I) Plaquetas e células endoteliais no compartimento superior; II) Plaquetas no compartimento inferior e células endoteliais no compartimento superior.

4.11 ENSAIO DE MIGRAÇÃO CELULAR DE HUVEC: TÉCNICA DE *SCRATCH*.

Para avaliar a capacidade de migração das células HUVEC, foi feita uma pequena injúria (risco) na monocamada de células endoteliais. Para isso, células HUVEC na concentração de 1 $x10^5$ células/ml, foram cultivadas em placas de 24 poços (500 µl/ poço) por 24 horas (37ºC, 5% CO_2). Após este período, foi realizado um único risco, com uma ponteira de 200 µl, perpendicular ao fundo do poço, sempre no mesmo sentido. Posteriormente, removeu-se todo o meio de cultura e adicionou-se o meio de cultura incompleto (Ham´s F12-K,

suplementado com fator de crescimento neural, antibiótico e SFB 2%) na presença ou ausência de plaquetas (1 x10^5 plaquetas/ ml; 500 µl) de indivíduos controle e pacientes. Após 20 horas de co-incubação, foram tiradas 3 fotos de cada poço (aumento de 40X, equipamento Zeiss Axiovert S100). Para quantificar a porcentagem de migração, calculou-se a área do risco (espaço sem células) no tempo 0 (T=0) e após as 20 horas de incubação.

Os cálculos foram realizados com o auxílio do software *ImageJ_Angiogenesis Analyzer* e os resultados obtidos foram adicionados à fórmula (I). Para este experimente utilizamos apenas plaquetas isoladas.

$$\text{Migração} = \frac{\text{Área tempo=0} - \text{Área amostra}}{\text{Área tempo=0}} \; x \; 100 \quad \text{(I)}$$

4.12 COLETA DO SOBRENADANTE DE CÉLULAS HUVEC E PLAQUETAS PARA ENSAIO MULTIPLEX.

Foi utilizado o *Human Angiogenesis A Premixed Mag Luminex Performance Assay (R&D Systems)* para quantificar as concentrações de angiopoietina-1, endostatina, FGF básico e ácido, PlGF, PDGF-AA, PDGF-BB, trombospondina-2 e VEGF (Quadro 3) no sobrenadante da co-cultura de HUVEC com plaquetas isoladas de pacientes HbSS ou HbSC e indivíduos controles HbAA. Para isso, placas de 24 poços foram preparadas com 24 horas de antecedência (5x10^4 HUVECs/poço). Após esse período, as plaquetas foram adicionadas ao poço (1x10^5 plaquetas/poço; 500 µL). As co-culturas foram mantidas durante 20 horas (37ºC, 5% CO_2). Além disso, as células HUVECs foram incubadas na presença de meio de cultura F12 K, suplementado com 2% de soro fetal bovino (grupo basal) ou na presença do fator de crescimento vascular VEGF (10 ng/ml, controle positivo). Para avaliação do perfil angiogênico do sobrenadante das plaquetas, as mesmas foram mantidas, sob as mesmas condições que as células endoteliais (20 horas, 37ºC, 5% CO_2). Ao final dos ensaios, o sobrenadante foi coletado, alíquotado e congelado (-80°C), para posterior análise.

As amostras foram medidas em duplicatas e lidas no equipamento *Bioplex* 200 (Bio-Rad) do LaCTAD (Laboratório Central de Tecnologias de Alto Desempenho) da Universidade Estadual de Campinas –UNICAMP. A curva de calibração para cada fator foi analisada por regressão logística 4PL e 5PL. Os dados foram considerados confiáveis se pelo

menos cinco pontos da curva de calibração estivessem entre 70 e 130% dos valores esperados recomendado pelo fabricante. O limiar de detecção de cada kit é apresentado no quadro 3.

Quadro 3: Intervalos de detecção de cada fator quantificado através do kit comercial *Human Angiogenesis A Premixed Mag Luminex Performance Assay.*

FATOR ANGIOGÊNICO	INTERVALO DE DETECÇÃO (Concentrações)
Angiogenina	0,36 pg/mL a 3.002 pg/ml
Angiopoitina 1 (ANG-1)	6,65 pg/mL a 31.129 pg/ml
Endostatina	5,81 pg/mL a 21.808 pg/ml
Fator derivado de fibroblastos (FGF ácido)	1,71 pg/mL a 7.066 pg/ml
Fator de crescimento placentário (PIGF)	0,59 pg/mL a 2.461 pg/ml
Fator derivado de plaquetas (PDGF AA)	0,22 pg/mL a 955 pg/ml
Fator derivado de plaquetas (PDGF BB)	1,44 pg/mL a 4.139 pg/ml
Fator de crescimento vascular (VEGF)	0,43 pg/mL a 1.829 pg/ml
Trombospondina	11,25 pg/mL a 46.072 pg/ml

5. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para a análise dos resultados, foram utilizados os testes não-paramétricos de *Kruskal Wallis*, seguido pelo do teste de *Dunn*, para comparações entre mais de dois grupos, ou, *Mann-Whitney*, para comparação entre dois grupos. Foram consideradas diferenças estatisticamente significativas quando $P<0,05$.

6. RESULTADOS

6.1 CONFIRMAÇÃO DO FENÓTIPO DAS CÉLULAS ENDOTELIAIS USADAS EM CULTURA, POR CITOMETRIA DE FLUXO.

Com o objetivo de confirmar se as células mantidas em cultura, entre a 14º a 21º passagem, utilizadas nesse estudo, expressavam o fenótipo da célula endotelial da linhagem HUVEC, avaliou-se a expressão dos marcadores, CD31, CD34, CD45, CD105, CD133, CD144 e CD146, de acordo a metodologia usada por Kiran e colaboradores, 2011 (113).

Tabela 1: Resultados obtidos a partir da análise de marcadores por citometria de fluxo.

ANTICORPO	RESULTADO ESPERADO	RESULTADO OBTIDO
CD31	Positivo	+++
CD34	Positivo ou Negativo	-
CD45	Negativo	-
CD105	Positivo	+++
CD133	Negativo	-
C144	Positivo	+++
CD146	Positivo	+++

Células endoteliais HUVECs na 16 º passagem. Considerou-se como resultado positivo (+) a expressão acima de 0% a 33,3%; (++) de 33,4% a 66,6% e (+++) valores acima de 66,7%. Os valores de 0% foram considerados como negativo (-).

Os dados obtidos mostraram que as células testadas expressam somente os marcadores CD31, CD105 CD 146, CD144 (Tabela 1 e Figura 4), os quais são compatíveis com células da linhagem de endotelial.

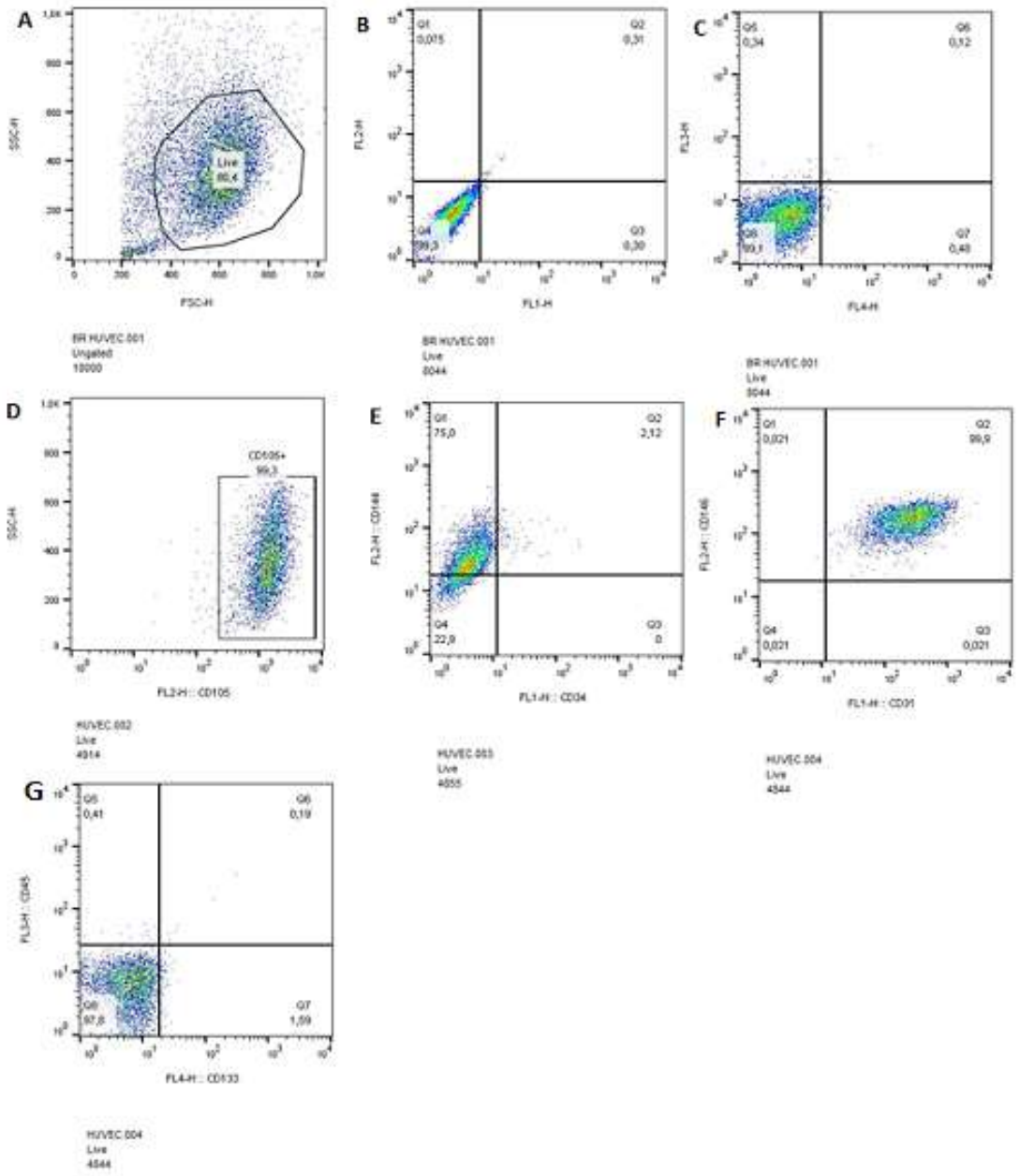

Figura 4: Painel de citometria da 16ª passagem das células endoteliais em cultura (HUVEC) utilizadas no estudo. Os scatter plots A, B e C correspondem ao branco (células sem marcação). (A) Scatter plot representativo demonstrando FSC (forward scatter; indicativo de tamanho) x SSC (side scatter; indicativo de granulosidade) das células e o gating das células. (B) e (C) representam o controle da não marcação das células pelos fluorocrômos estudados; D) representa a média de intensidade de fluorescência (MIF) para a marcação do anticorpo anti-CD105-PE; E) demonstra as MIF para as marcações dos anticorpos anti-CD34-FITC e anti-CD144-PE; F) representa as MIF para as marcações dos anticorpos anti-CD31-FITCH e anti-CD146-PE; G) representa as MIF para as marcações dos anticorpos anti-CD133-APC e anti-CD45- PerCP.

6.2 PACIENTES COM ANEMIA FALCIFORME HbSS (SS)

6.2.1 COMPARAÇÃO DOS PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS.

A análise do hemograma da coorte de pacientes HbSSe controles (HbAA) usada no presente estudo mostrou que os pacientes HbSS, apresentam contagens significativamente reduzidas de células vermelhas totais, hemoglobina, hematócrito e contagens aumentadas do volume corpuscular médio e plaquetas, quando comparados ao grupo de indivíduos saudáveis . Os valores estão apresentados na Tabela 2 abaixo.

Tabela 2: Comparação dos parâmetros demográficos e hematimétricos de controles e pacientes com anemia falciforme HbSS.

	AA	SS
N	**20**	**40**
Idade	**30 (30; 19-44)**	**40 (42;28-55)**
Homens/ Mulheres	**9/ 11**	**16/ 24**
Número de indivíduos em terapia com hidroxiuréia	**N/A**	**37**
Células vermelhas totais (10^6 g/L)	5,0 (3,09; 3,1-5,9)	*** 2,1 (2,0; 1,9- 2,6)
Hematócrito (%)	42,6 (43,1; 37,2-48,2)	*** 27,7 (27,6; 20,4- 35,5)
Hemoglobina (g/dL)	14,7 (14,8; 12,8-17,3)	*** 9,2 (9,1; 6,8- 12,1)
Volume corpuscular médio (fL)	87,8 (89,5; 80,2-95,4)	** 118,95 (118,1; 97,1- 136,2)
Células brancas totais (x10^9/L)	5,8 (5,6; 3,9-6,9)	5,9 (5,8; 4,2- 8,8)
Neutrófilos (10^3/µL)	3,7 (3,8; 2,1-5,6)	2,4 (2,6; 1,3-3,4)
Plaquetas (x10^9/L)	255,4 (255,0; 152,0- 430,0)	** 379,3 (305,0; 146,0- 890,0)
Hemoglobina Fetal (%)	N/A	11,9 (11,9; 2,6-23,5)

Dados hematimétricos de indivíduos controles (AA) e pacientes com anemia falciforme, HbSS (SS). Os hemogramas foram realizados utilizando-se o Sistema de Hematologia 120 *Advia* (*Bayer Diagnostics, Tarrytown*, NY, EUA). N/A, não aplicável. Valores expressos em média (mediana; mínimo e máximo). *P<0,05; **P<0,01; ***P<0,001, comparado ao grupo AA, determinado pelo teste de *Mann Whitney*.

6.2.2 AVALIAÇÃO DA ATIVAÇÃO PLAQUETÁRIA EM PACIENTES COM ANEMIA FALCIFORME HbSS.

A fim de comparar o perfil de ativação das plaquetas de pacientes HbSS) e indivíduos controles, avaliou-se a expressão das moléculas de adesão e receptores: P-selectina (Figuras 5A e B), CD41a (Figuras 5C e D), atividade da integrina αIIβ3 (usando o anticorpo PAC-1, Figuras 5E e F), PAR-1 (Figuras 6A e B) e PAR-4 (Figuras 6C e D). Para esse conjunto de experimentos utilizou-se o plasma rico em plaquetas (PRP).

Não foram encontradas diferenças significativas na expressão, % ou média de intensidade fluorescência (MIF) dos receptores P-selectina e CD41a (subunidade da integrina CD41a/CD61, ou $\alpha_{IIb}\beta_3$), e na atividade de $\alpha_{IIb}\beta_3$ (avaliada pelo anticorpo PAC-1), entre os grupos.

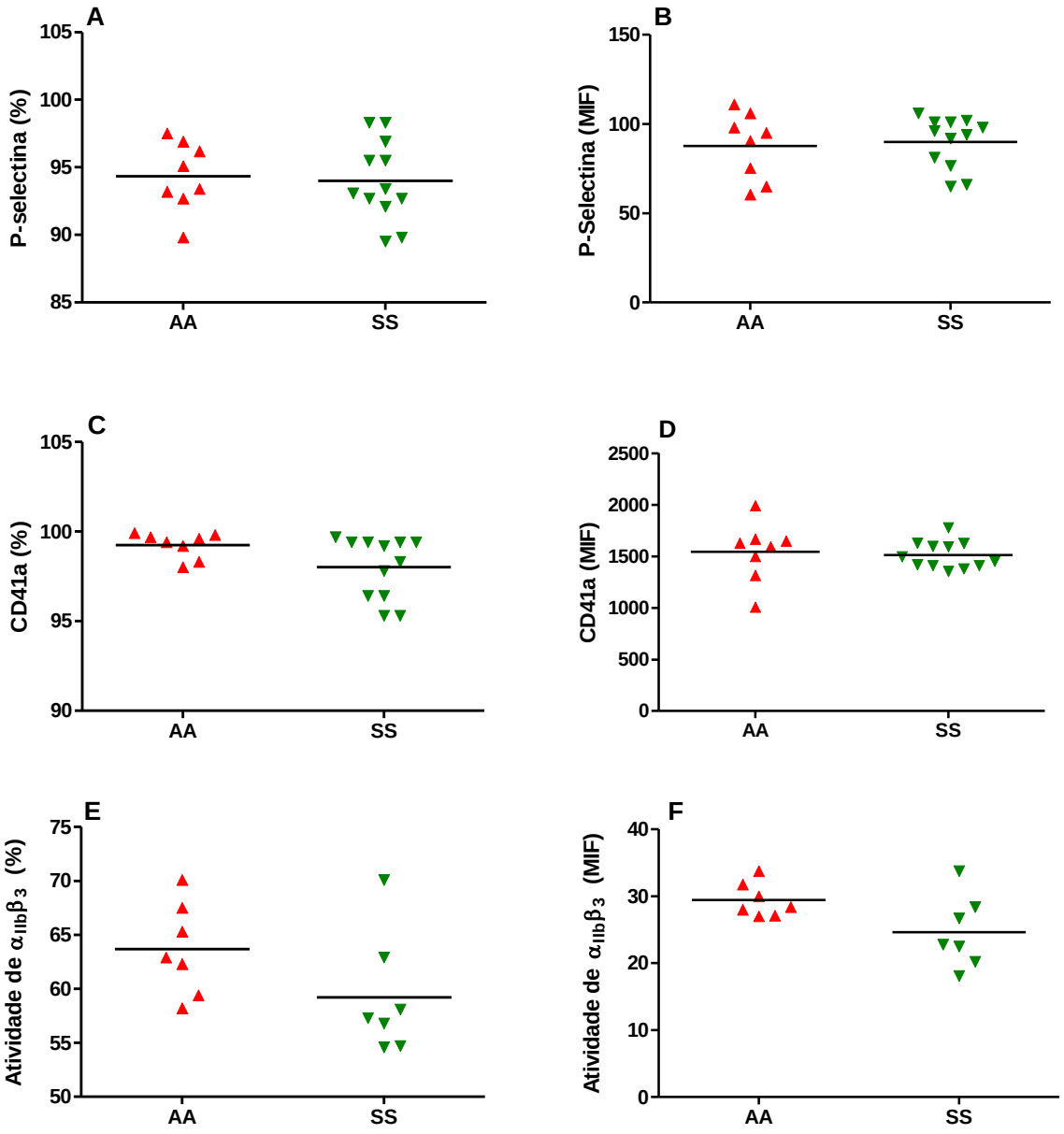

Figura 5: Expressão (% e MIF) das moléculas P-selectina (A e B) e CD41a (C e D) e da atividade de αIIbβ3 (E e F) nas plaquetas de pacientes com anemia falciforme e controles. Determinado por citometria de fluxo no plasma rico em plaquetas (PRP, $1x10^6$ plaquetas/tubo) de indivíduos controle (AA, n=7) e pacientes com anemia falciforme (SS, n=7). Resultados expressos como média. MIF, média de intensidade de fluorescência. P>0,05; comparando o grupo SS ao grupo AA, determinado pelo teste de *Mann Whitney*.

Com relação aos receptores de trombina PAR-1 e PAR-4 (Figuras 6A e B), foi possível observar que as plaquetas dos pacientes HbSS, da coorte estudada, apresentam um aumento significativo na expressão do receptor PAR-1 (Figura 6B) e diminuição significativa

na expressão do receptor PAR-4 (Figura 6D), quando comparadas com as plaquetas de indivíduos controles (AA).

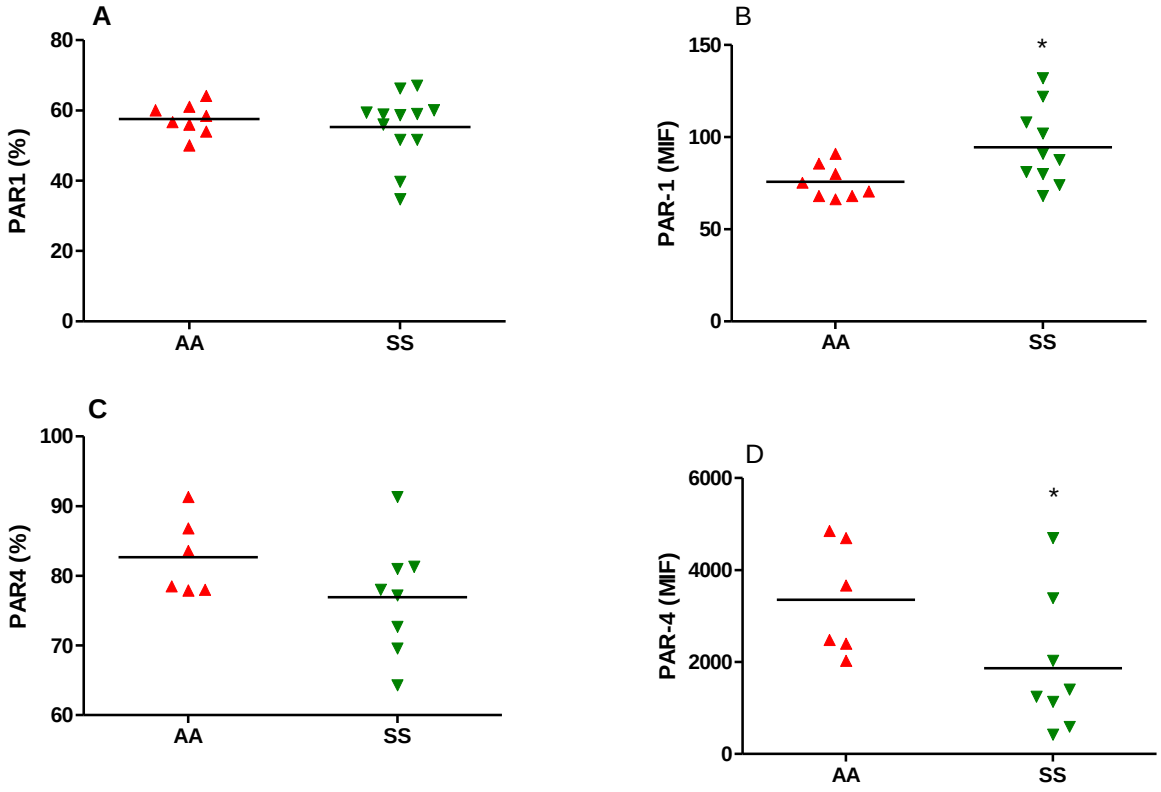

Figura 6: Expressão (% e MIF) dos receptores de trombina PAR-1 (A e B) e PAR-4 (C e D) nas plaquetas de pacientes com anemia falciforme e controles. Análise por citometria de fluxo, realizada a partir do plasma rico em plaquetas (PRP, $1x10^6$ plaquetas/tubo) de indivíduos controle (AA) e pacientes com anemia falciforme (SS). MIF, média de intensidade de fluorescência. Resultados expressos como média. *P<0,05 comparado ao grupo AA, determinado pelo teste de Mann Whitney.

6.2.3 EFEITO DA PRESENÇA DAS PLAQUETAS DE PACIENTES COM ANEMIA FALCIFORME (HbSS) NA VIABILIDADE DAS CÉLULAS HUVEC.

Buscando avaliar se as condições de cultura propostas para esse estudo (Figura 7) poderiam influenciar na viabilidade das células endoteliais HUVEC, células endoteliais ($5x10^3$ células/poço) foram mantidas em cultura por 24 horas na presença de meio de cultura F12K, suplementado com 2% de soro fetal bovino (basal) e em co-cultura com plaquetas de indivíduos controles nas concentrações, $1x10^6$ plaquetas/mL; $1x10^7$ plaquetas/mL e $1x10^8$ plaquetas/mL (100 µl/ poço).

As diferentes concentrações de plaquetas testadas (Figura 7) não diminuíram de forma significante a viabilidade celular das células HUVECs. Não houve danos tóxicos para essas células quando mantidas em co-cultura com plaquetas.

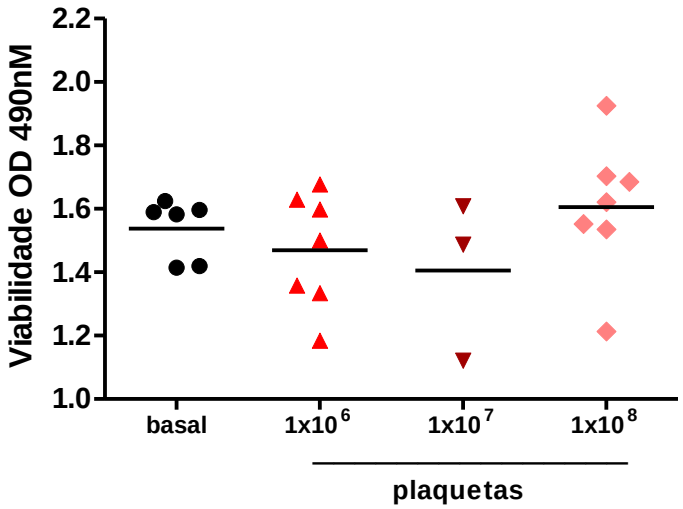

Figura 7: Efeitos das plaquetas de indivíduos saudáveis, em diferentes concentrações, na viabilidade das células HUVEC, através da técnica de MTS. As células endoteliais foram cultivadas por 24 horas na presença de meio de cultura F12 K (basal) e plaquetas em estado basal na concentração de $1x10^6$ plaquetas/ml (n=7); $1x10^7$ plaquetas/ml (n=3) e $1x10^8$ plaquetas/ml (n=7). Cada barra representa a média. Foram realizados 3 experimentos independentes em triplicata.

Sabendo que as plaquetas de indivíduos controles não influenciariam negativamente na viabilidade das células HUVECs, o experimento foi realizado usando, desta vez, as plaquetas de pacientes HbSS. Contudo, nesse experimento foram usadas plaquetas isoladas de pacientes que estavam fazendo uso de HU e de pacientes que ainda não estavam em terapia com a medicação, com o objetivo de avaliar se a HU poderia interferir nos resultados obtidos.

Como mostrado na Figura 8, é possível observar que, independentemente da terapia com HU, as plaquetas dos pacientes HbSS, na concentração de $1X10^6$ plaquetas/mL (100µl/poço), não são capazes de intervir, de forma negativa, na viabilidade das células HUVECs.

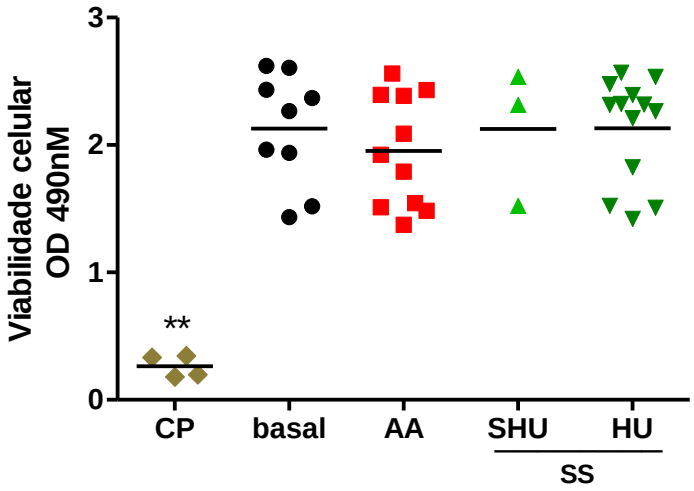

Figura 8: Avaliação do efeito das plaquetas na viabilidade celular de células endoteliais HUVEC, pela técnica de MTS. Plaquetas isoladas ($1x10^5$ plaquetas/poço) de indivíduos controle (AA), pacientes com anemia falciforme (SS), em uso de hidroxiureia (HU) ou não (SHU), foram co-cultivadas na presença das células endoteliais HUVEC em cultura ($1x10^4$ células/poço) por 24 horas. As HUVEC foram incubadas na presença de meio de cultura F12 K, suplementado com 2% de soro fetal bovino (grupo basal). Como controle positivo (CP) de morte celular, as células foram incubadas na ausência de meio de cultura e na presença de PBS. Cada barra representa a média. **P<0,01, comparado aos outros grupos, determinado por Kruskal Wallis, seguido pelo teste de Dunn**.**

6.2.4 AVALIAÇÃO DA FORMAÇÃO DE ESTRUTURAS TIPO CAPILARES PELAS CÉLULAS ENDOTELIAIS NA PRESENÇA DE PLAQUETAS ISOLADAS OU PRP.

Sabendo que as condições de cultivo para a co-cultura de plaquetas e células endoteliais não afeta a viabilidade das células HUVEC, buscou-se avaliar a capacidade das plaquetas de estimular a formação de estruturas tipo capilares *in vitro*. Para isso, as HUVECs foram incubadas com plaquetas (Figuras 9, 10 e 11) ou PRP (Figura 12) de pacientes HbSS e controles.

Em uma primeira etapa, testamos diferentes concentrações de plaquetas ($1x10^6$ plaquetas/mL; $1x10^7$ plaquetas/mL e $1x10^8$ plaquetas/ml; 100 µl/ poço), como mostra a Figura 10. A análise das imagens mostrou que a co-cultura das células endoteliais com as plaquetas nas concentrações de $1x10^7$ plaquetas/mL e $1x10^8$ plaquetas/mL (100 µl/ poço) resultou na formação de capilares. No entanto, foram observados também borrões (Figuras 9C e D), os quais dificultaram a análise dos dados. Esse perfil foi encontrado em várias tentativas.

Diante desse achado, a concentração de $1x10^6$ plaquetas/ml foi escolhida para dar continuidade aos experimentos.

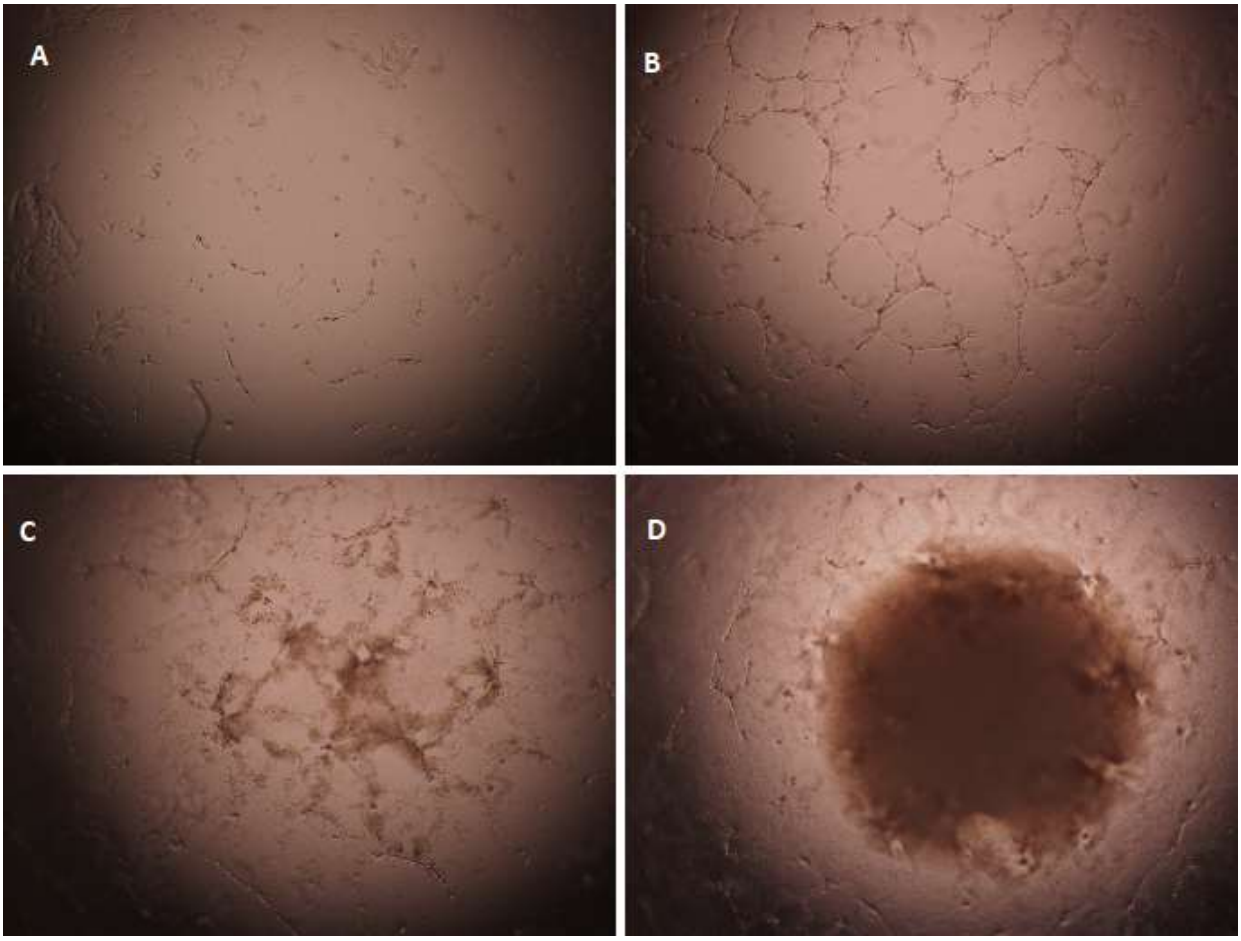

Figura 9: Imagens representativas das estruturas tipo capilar das células HUVEC cultivadas com diferentes concentrações de plaquetas. Plaquetas isoladas de indivíduos saudáveis foram cultivadas na presença de (A) meio de cultura F12K suplementado com SFB 2% (basal), B) meio de cultura F12K suplementado com SFB 2% + $1x10^6$ plaquetas/ml, C) $1x10^7$ plaquetas/ml e D) $1x10^8$ plaquetas/ml. As imagens A, B, e C são representativas de poços da cultura, após 20 horas de incubação, em microscópio invertido (aumento de 40X, equipamento Zeiss Axiovert S100) de contraste de fase com câmera acoplada (Moticam 2500). É possível notar nas imagens C e D a presença de um borrão (cor escurecida) que dificulta a análise dos capilares.

O próximo passo foi avaliar se o uso de HU por pacientes HbSS, poderia influenciar no efeito das suas plaquetas na formação de estruturas capilares *in vitro*. No entanto, não foram encontradas diferenças significativas na formação de estruturas capilares pelas células endoteliais que foram cultivadas com plaquetas de pacientes em uso de HU ou cultivadas com plaquetas de pacientes que não estavam em tratamento com a medicação (Figura 10). Os resultados mostraram que as plaquetas dos pacientes HbSS, independentemente do tratamento com a HU, são capazes de aumentar significativamente o número de estruturas

capilares (Figura 10A) e de malhas de capilares (Figura 10C), em comparação ao basal (sem plaquetas). Diante disso, optou-se por dar continuidade aos experimentos usando apenas pacientes que estavam em terapia com HU, os quais são maioria no nosso grupo experimental.

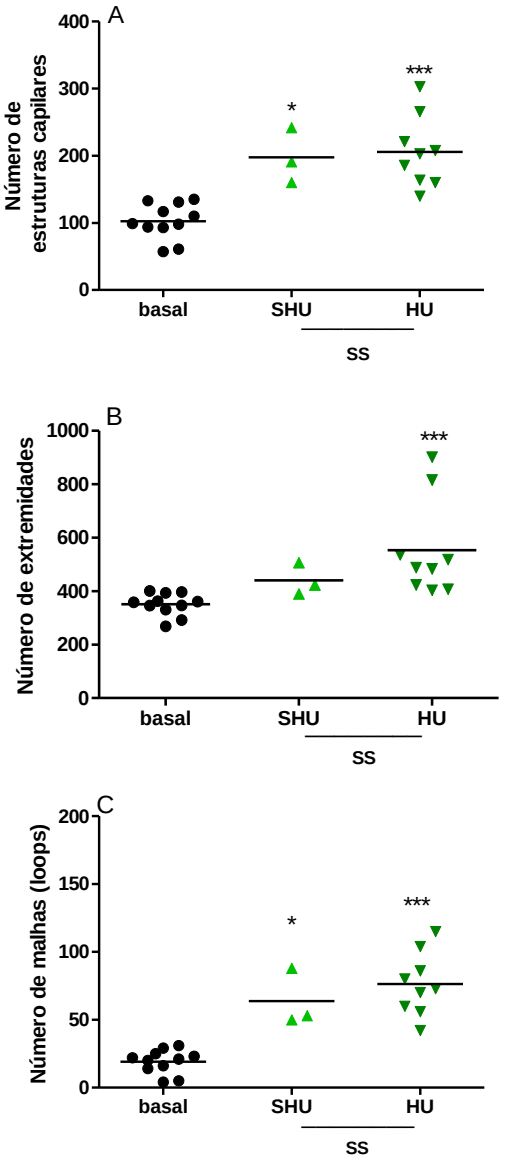

Figura 10: Avaliação da formação de estruturas capilares a partir do co-cultivo de células endoteliais com plaquetas de pacientes em uso ou não de hidroxiuréia. Foram utilizadas células HUVEC ($5x10^3$ células/poço) cultivadas em meio de cultura F12K com SFB 2% (basal, n=11) e plaquetas isoladas ($1x10^5$ plaquetas/poço) de pacientes com anemia falciforme (SS), em uso de hidroxiuréia (HU, n=9) e pacientes que não faziam uso da HU (SHU, n=3). Número de estruturas capilares (ramos unidos por 2 pontos de ramificações). B) número de pontos de ramificações (extremidades que se ramificam em um ou mais ramos). C) número de malhas (loops). Resultados expressos como média. *P<0,05; **P<0,01 ***P<0,001, comparado ao basal, determinado por Kruskal Wallis, seguido pelo do teste de Dunn.

Posteriormente, comparou-se a capacidade das plaquetas isoladas de controles e pacientes HbSS de influenciar nos diferentes aspectos da formação das estruturas capilares *in vitro*, como mostram as figuras 11 e 12.

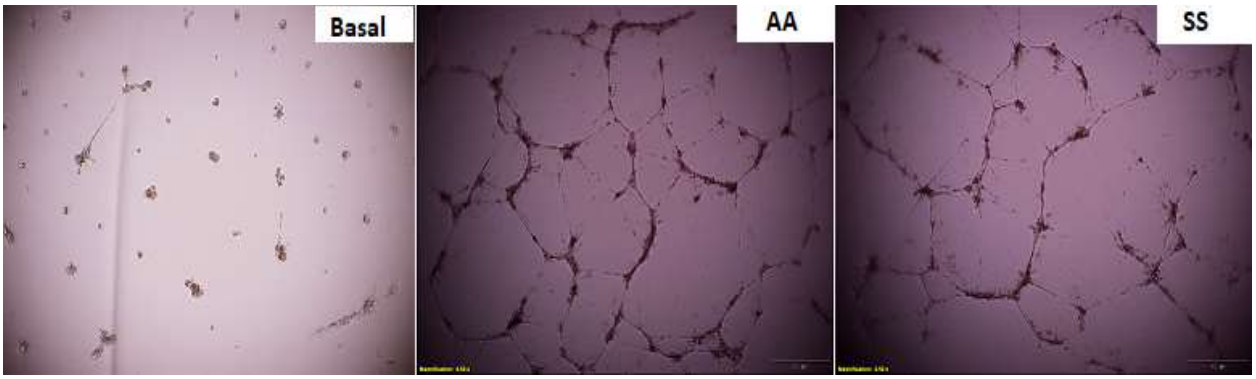

Figura 11: Imagens representativas das estruturas tipo capilares formadas a partir da co-cultura de células endoteliais e plaquetas isoladas. Fotos tiradas dos poços contendo células HUVEC ($5x10^4$ células/ml) após a incubação por 20 horas em meio de cultura F12K com SFB 2% (basal) ou com plaquetas ($1x10^6$ plaquetas/ml, 100µL) de indivíduos controle (AA) e pacientes com anemia falciforme (SS). Os ensaios foram realizados em triplicata e visualizados através de microscópio invertido (aumento de 40X).

A análise dos dados mostrou que as plaquetas de indivíduos saudáveis e pacientes HbSS são capazes de aumentar o número de estruturas capilares (Figura 12A), o número de extremidades (Figura 12B), o número de nós (Figura 12C), a quantidade de malhas de capilares (Figura 12D) e o tamanho total dos capilares (Figura 12F) em relação às HUVECs incubadas na ausência de plaquetas. Não foram encontradas, no entanto, diferenças significativas entre os grupos HbAA e HbSS.

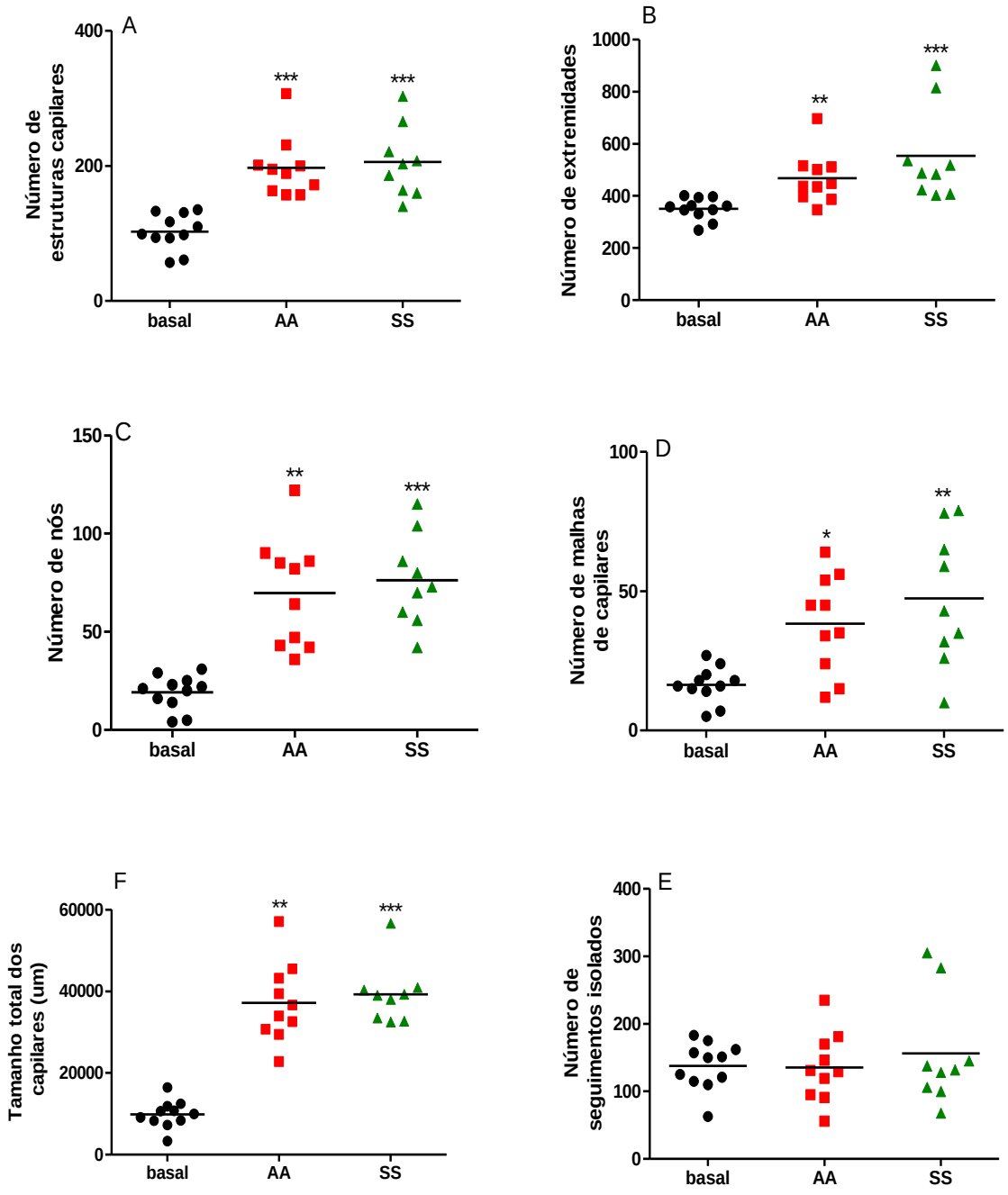

Figura 12: Quantificação das estruturas capilares de células HUVEC (5x10^3 células/poço) cultivadas em meio de cultura F12K com SFB 2% (basal, n=11) e plaquetas isoladas (1x10^5 plaquetas/poço) de indivíduos saudáveis (AA; n=9) ou de pacientes com anemia falciforme (SS; n=9). A) Número de estruturas capilares (ramos unidos por 2 pontos de ramificações). B) Número de pontos de ramificações (extremidades que se ramificam em um ou mais ramos). C) Número de nós (extremidades em que se conectam dois ou mais ramos). D) Número de malhas de capilares (loops). E) Tamanho total dos capilares. F) Número de segmentos isolados (pontos que não formam ramos). Resultados expressos como média. *P<0,05; **P<0,01 ***P<0,001, comparado ao basal, determinado por Kruskal Wallis, seguido pelo do teste de Dunn.

.

O mesmo experimento também foi realizado utilizando-se o plasma rico em plaquetas (PRP) de indivíduos saudáveis e pacientes HbSS, e os resultados obtidos foram comparados com os resultados exibidos pelos mesmos grupos, quando utilizamos apenas as plaquetas isoladas (Figura 13).

Os dados obtidos mostram que tanto o PRP, quanto as plaquetas isoladas de controles AA e pacientes HbSS, são capazes de aumentar a formação de estruturas capilares, no entanto, de maneira geral, a variação dentro dos grupos foi menor quando usamos plaquetas isoladas (Figuras 13A, B e C).

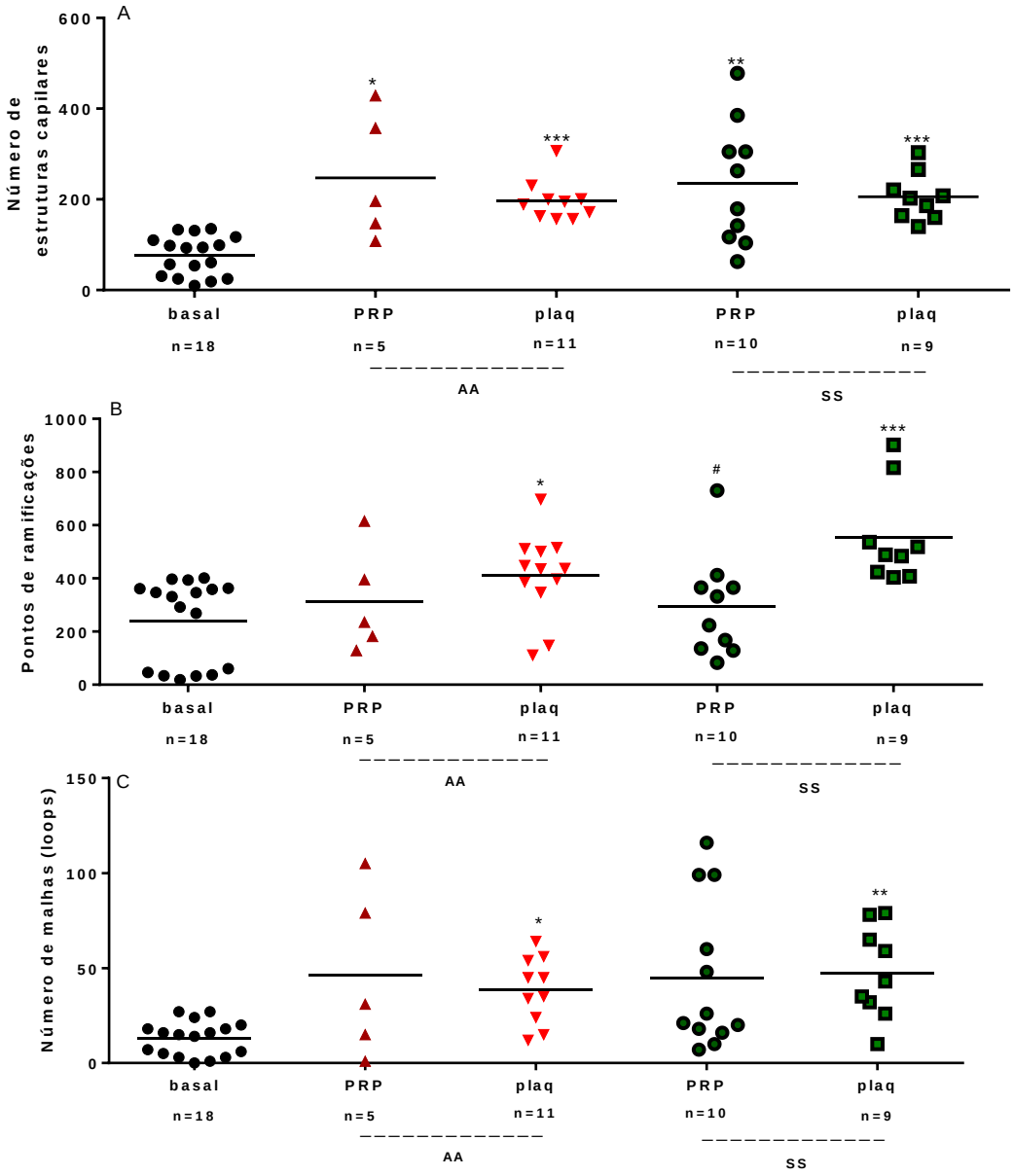

Figura 13: Comparação da quantificação das estruturas capilares de células HUVEC na presença de plasma rico em plaquetas ou plaquetas isoladas. Células HUVEC ($5x10^3$ células/poço) foram cultivadas em meio de cultura F12K com SFB 2% (basal) e na presença de plasma rico em plaquetas (PRP, $1x10^5$ plaquetas/poço) ou plaquetas isoladas ($1x10^5$ plaquetas/poço) de indivíduos saudáveis (AA), pacientes com anemia falciforme em uso contínuo de hidroxiureia (SS). A) Número de estruturas capilares (ramos unidos por 2 pontos de ramificações). B) Número de pontos de ramificações (extremidades que se ramificam em um ou mais ramos).C) Número de malhas de capilares (loops). Resultados expressos como média. *P<0,05; **P<0,01 ***P<0,001, comparado ao basal, $^{\#}$P<0,05, comparação entre PRP e plaquetas de pacientes SS, determinado por *Kruskal Wallis*, seguido pelo do teste de *Dunn*.

6.2.5 AVALIAÇÃO DA PROLIFERAÇÃO CELULAR DAS HUVECS NA PRESENÇA DE PLAQUETAS

A proliferação das células endoteliais, quando co-cultivadas com plaquetas isoladas, não diferiu das células cultivadas apenas com meio de cultura (Figura 14).Também, não foram encontradas diferenças significativas quando comparamos os grupos HbSS e HbAA.

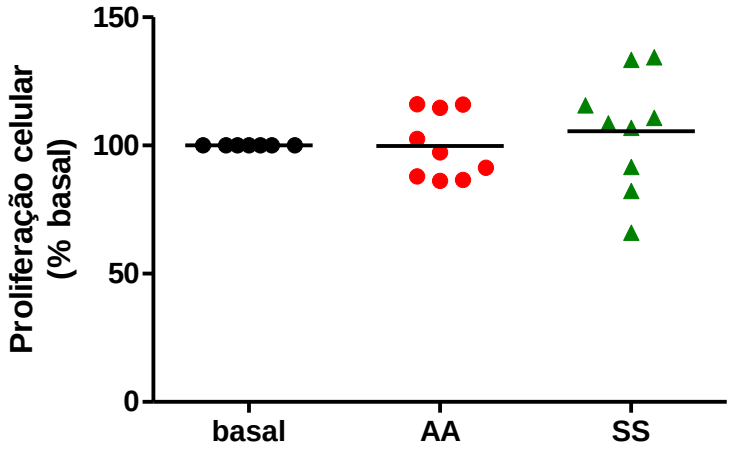

Figura 14: Efeito das plaquetas de indivíduos controles (AA, n=9) ou de pacientes com anemia falciforme (SS, n=9) na proliferação das células endoteliais (HUVECs). As HUVEC ($1x10^4$ células/poço) foram incubadas na presença de meio de cultura F12 K, suplementado com SFB 2% na presença de plaquetas isoladas de indivíduos controles ou pacientes com AF ($1x10^5$ plaquetas/poço). Cada barra representa a média. Não foram encontradas diferenças entre os grupos, determinado por Kruskal Wallis, seguido pelo do teste de Dunn.

6.2.5 AVALIAÇÃO DA INVASÃO CELULAR DAS HUVEC NA PRESENÇA DE PLAQUETAS EM CÂMARA DUPLA COM MATRIGEL

Os ensaios de invasão foram realizados em câmara dupla de Matrigel, que forma dois compartimentos no poço. Deste modo, o experimento foi realizado em duas condições distintas: I) Células HUVECs no compartimento superior e as plaquetas de controles ou pacientes HbSS no compartimento inferior (Figura 15B); e II) Células HUVECs no mesmo compartimento que as plaquetas, ambas no poço superior (Figura 15C). Nas duas condições, as células foram mantidas em cultura por 20 horas, com a intenção de avaliar a capacidade das plaquetas de estimularem a migração celular por contato direto e por contato indireto.

Os dados obtidos (Figura 15B) demonstram que quando plaquetas e células endoteliais são co-cultivadas em contato indireto, com separação de compartimentos por insertos transwell (condição I), as plaquetas de pacientes HbSS e controles são capazes ainda de estimular a invasão das células HUVECs, de forma significativa. Nesta condição, portanto, não há contato direto entre as células e as plaquetas, e os resultados obtidos foram comparados ao grupo basal, no qual as células foram cultivadas apenas na presença de meio de cultura. Contudo, ao avaliar a condição II), na qual plaquetas e células endoteliais são co-cultivadas no mesmo poço (com contato direito), observou-se um aumento significativo de invasão celular apenas no grupo de pacientes HbSS (Figura 15C).

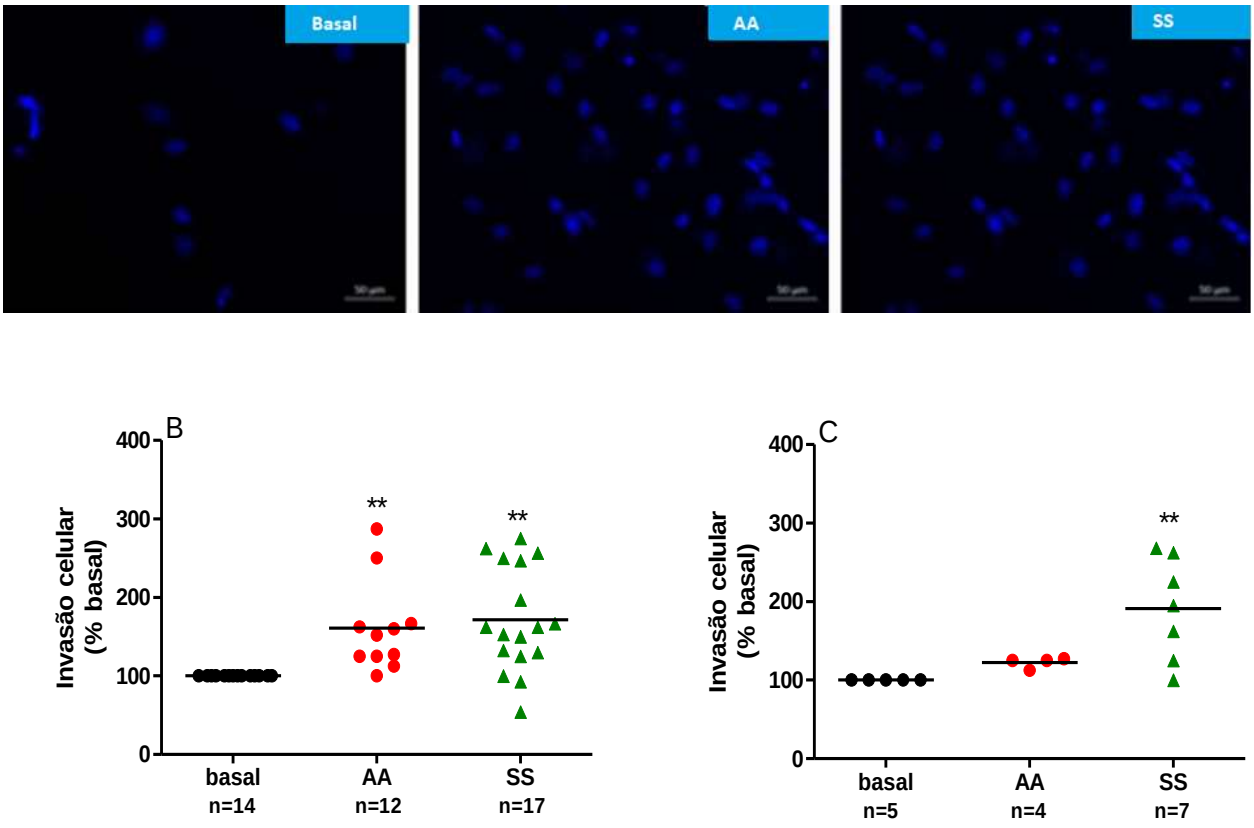

Figura 15: Ensaio de invasão das células HUVEC (2,5x10^3 células/poço), em câmara dupla de Matrigel, na presença de plaquetas isoladas (5x10^5 plaquetas/poço) de indivíduos controle (AA) e pacientes com anemia falciforme (SS). A) Imagens representativas das membranas (condição I), B) HUVECs cultivadas no poço superior e as plaquetas no poço inferior, separadas por insertos transwell (condição I); C) HUVECs e plaquetas cultivadas em contato, no poço superior (condição II). Resultados expressos como média. **P<0, 01, comparado ao basal, determinado por *Kruskal Wallis*, seguido pelo do teste de *Dunn*

Adicionalmente, o mesmo experimento foi realizado utilizando-se o plasma rico em plaquetas (PRP) de indivíduos saudáveis e pacientes HbSS , e os resultados obtidos foram comparados com os resultados exibidos pelos mesmos grupos, quando utilizamos apenas as plaquetas isoladas (Figura 16). Para esse experimento, foi utilizada a condição II, assim como mostramos na Figura 15C, na qual plaquetas ou PRP foram cultivadas no mesmo poço que as células HUVECs. Os resultados (Figura 16) indicam que ambos o PRP e as plaquetas isoladas de pacientes HbSS são capazes de aumentar a invasão das células HUVECs.

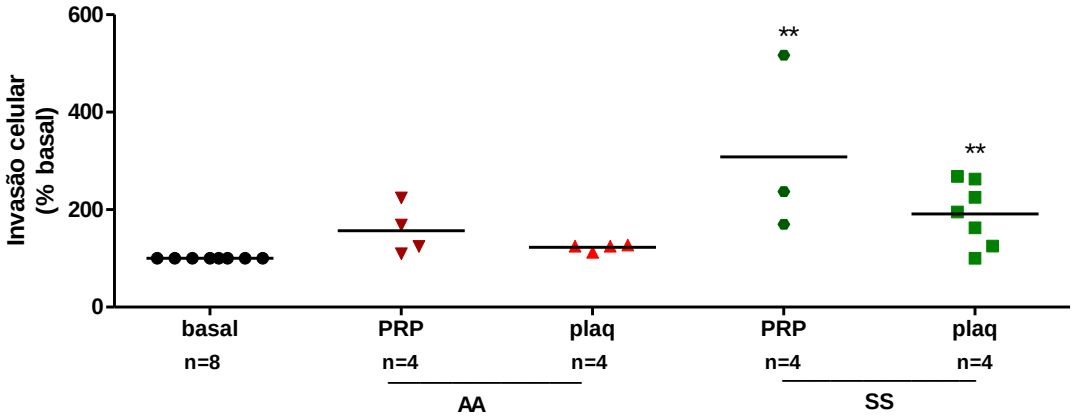

Figura 16: Comparação da capacidade de invasão celular das células endoteliais co-cultivadas na presença de plaquetas isoladas ou plasma rico em plaquetas de indivíduos controles (AA) e pacientes com anemia falciforme (SS). Ensaio de invasão das células HUVEC ($2{,}5x10^3$ células/poço) em câmara dupla de Matrigel, na presença de plasma rico em plaquetas (PRP, $5x10^5$ plaquetas/poço) e plaquetas isoladas ($5x10^5$ plaquetas/poço) de indivíduos controle (AA) e pacientes com anemia falciforme (SS). Resultados expressos como média. **P<0,01, comparado ao basal, determinado por *Kruskal Wallis*, seguido pelo do teste de *Dunn.*

6.2.6 AVALIAÇÃO DA MIGRAÇÃO DAS HUVEC NA PRESENÇA DE PLAQUETAS ISOLADAS, ATRAVÉS DA TÉCNICA DE SCRATCH.

Buscando avaliar se as plaquetas poderiam influenciar na migração das células endoteliais, as células HUVECs ($5x10^4$ células/poço) foram cultivadas por 24 horas em placas de 24 poços. Após este período, foi feito um risco no fundo da placa, com o auxílio de uma ponteira de 200 µL. Foram, então, adicionadas as plaquetas isoladas ($5x10^5$ plaquetas/poço) e as células foram incubadas por mais 20 horas. A migração das células foi calculada medindo-se a diminuição da área sem células em relação à área obtida no tempo 0 (Figura 17).

Os resultados mostram que a presença das plaquetas de indivíduos controles (AA) ou de pacientes HbSS (SS) aumenta a migração das células endoteliais (Figura 17B), tanto quanto o estímulo pelo fator de crescimento VEGF (10ng/ml). A migração nesses grupos favoreceu,, assim, o fechamento do "risco" após 20 horas de incubação, em relação ao grupo basal. Não foram encontradas diferenças significativas na migração das células endoteliais entre os co-cultivos com plaquetas de pacientes HbSS e de indivíduos controles.

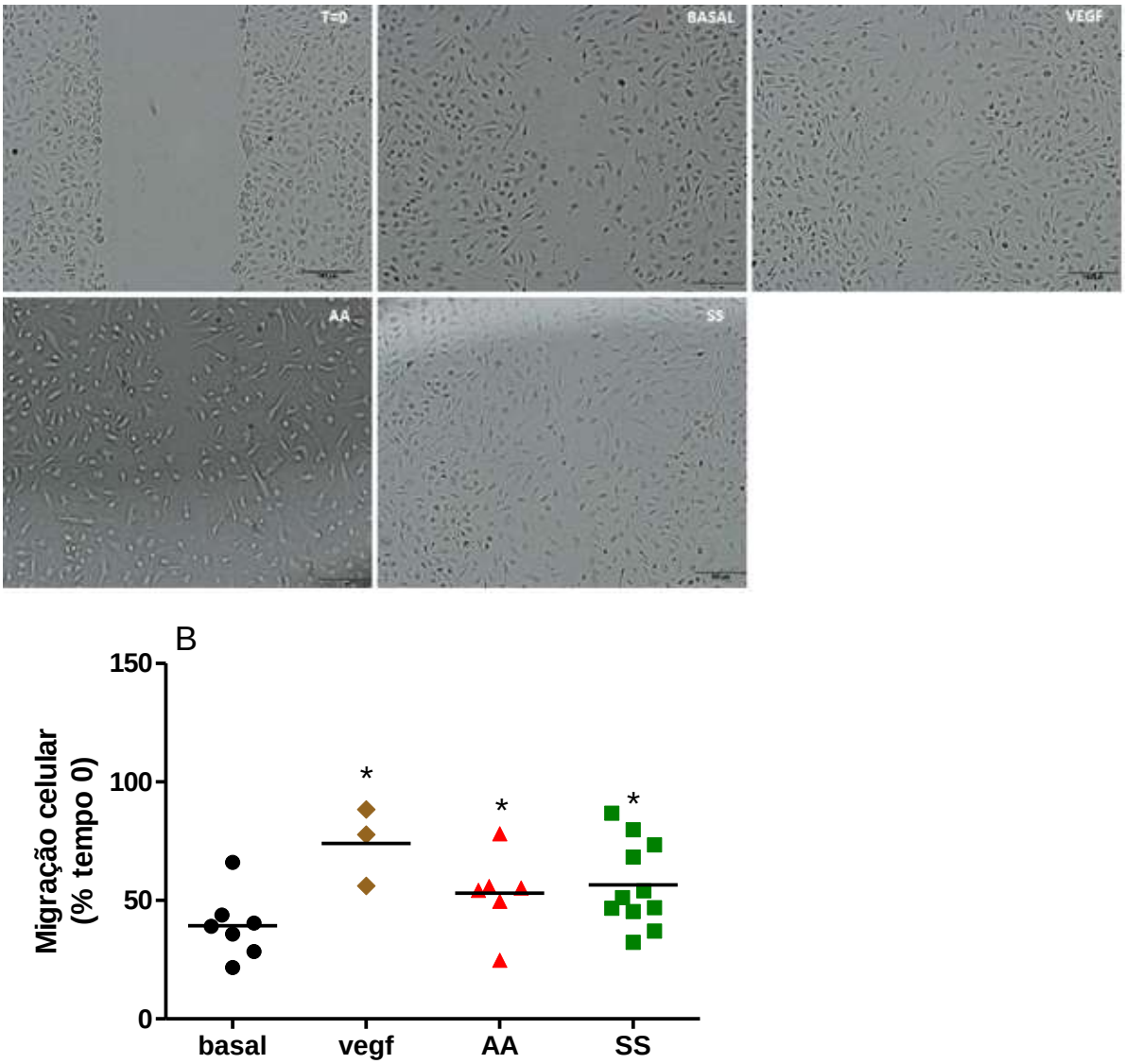

Figura 17: Ensaio de migração das células HUVEC na presença de plaquetas de indivíduos controle (AA, n=6) e pacientes com anemia falciforme (SS, n=11), pela técnica de *Scratch*. As HUVEC ($5x10^4$ células/poço) foram incubadas na presença de meio de cultura F12 K, suplementado com SFB 2%, grupo basal (n=7), ou na presença de plaquetas isoladas ($5x10^5$ plaquetas/poço) ou VEGF (10 ng/ml, controle positivo, n=3). A) Imagens representativas; B) Porcentagem de células HUVECs que migraram em comparação ao tempo 0. Resultados expressos como média e erro padrão. *P<0,05; comparado ao basal, determinado por *Kruskal Wallis*, seguido pelo do teste de *Dunn*.

6.2.7 AVALIAÇÃO DO PERFIL DE FATORES ANGIOGÊNICOS NO SOBRENADANTE DE PLAQUETAS.

Buscando comparar o perfil de liberação de fatores angiogênicos secretado por plaquetas de indivíduos controles e pacientes poderiam exibir em cultura, as plaquetas isoladas de controle e pacientes foram incubadas em meio F12K com 2% de SFB (o mesmo usado

na cultura de HUVECs) por 20 horas. Posteriormente, o sobrenadante das plaquetas incubadas foi coletado e usado para a quantificação de fatores que atuam como estimuladores da angiogênese (Figuras 18) e fatores que atuam como inibidores desse processo (Figura 19).

Os resultados mostram que o sobrenadante das plaquetas da coorte de pacientes com HbSS (SS) estudada contem concentrações significativamente elevadas de Angiopoitina (Figura 18A), Angiogenina (Figura 18B) e do fator derivado de plaquetas PDGF-AA (Figura 18E), quando comparadas ao sobrenadante das plaquetas do grupo de indivíduos controles (AA). Também, foi possível observar uma tendência de aumento do fator derivado de fibroblastos FGF-ácido (Figura 18C) e do fator de crescimento vascular VEGF (Figura 18G), em comparação ao grupo controle. Com relação aos fatores PDGF-BB (Figura 18F) e ao PIGF (Figura 18D), indivíduos saudáveis e um número considerável de pacientes com AF apresentaram concentrações inferiores ao valor mínimo detectável pelo kit utilizado (vide quadro 3) , não sendo possível a comparação entre os grupos.

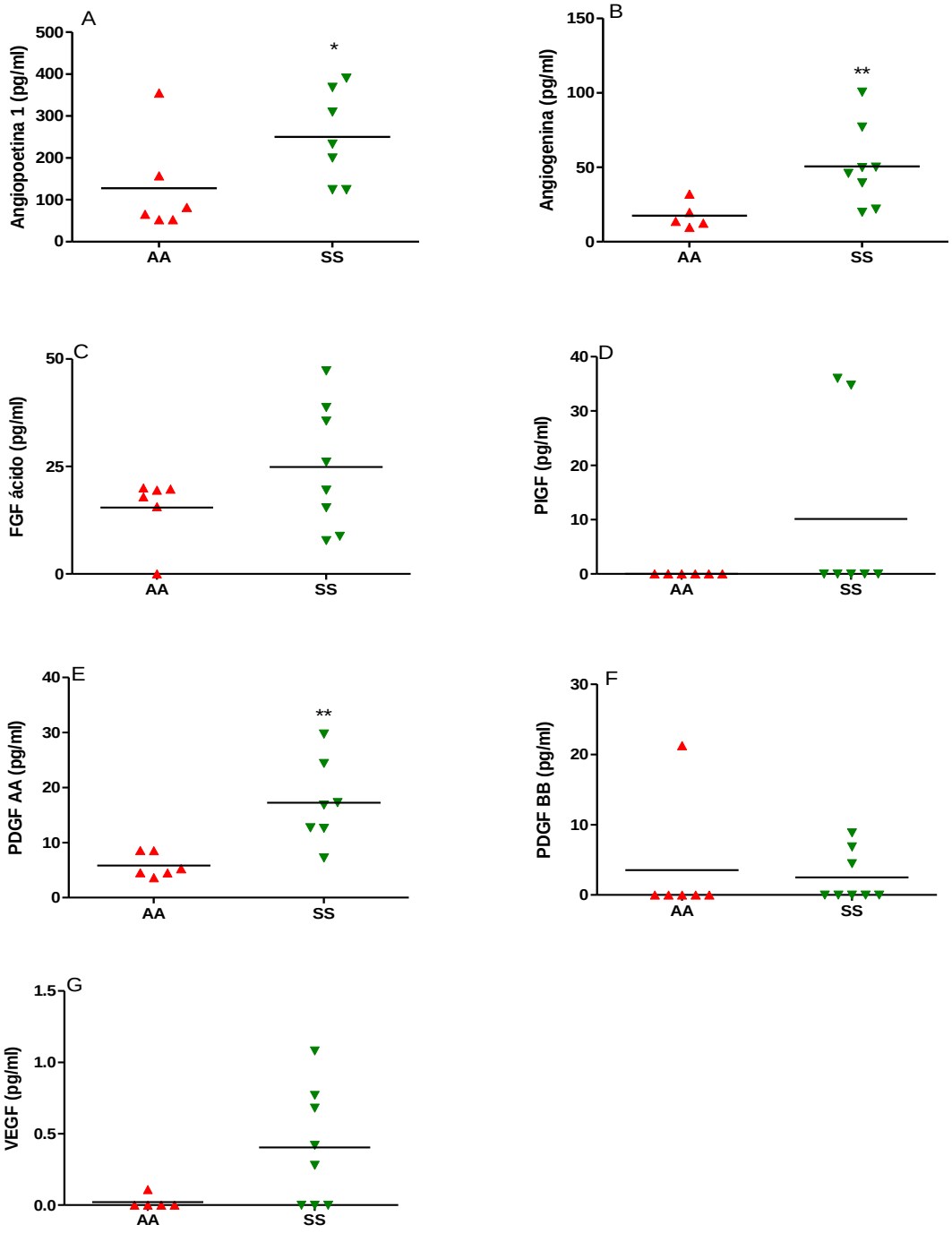

Figura 18: Análise do secretoma de fatores pró-angiogênico no sobrenadante de plaquetas isoladas de indivíduos controles e pacientes com AF. Concentrações de: A) Angiopoitina 1, B) Angiogeninca, C) fator de crescimento derivado de fibroblastos, D) fator de crescimento placentário, E) fator de crescimento derivado de plaquetas AA, F) fator de crescimento derivado de plaquetas BB, G) do fator de crescimento vascular, detectadas no sobrenadante de plaquetas isoladas ($5x10^4$ plaquetas/poço) de indivíduos saudáveis (AA) e pacientes com anemia falciforme (SS) incubadas por 20 horas. Resultados expressos como média. *P<0,05; comparado ao grupo controle AA, determinado por teste de *Mann Whitney*.

Em referência aos fatores que atuam como inibidores do processo angiogênico (Figura 19), observou-se uma tendência de elevação nas concentrações de endostatina (Figura 19A) no sobrenadante das plaquetas de pacientes com AF, em comparação ao grupo controle. Assim como ocorreu com os fatores PIGF e PDGF-BB, as concentrações de Trombospondina-2 (Figura 19B) foram inferiores às detectáveis pelo kit (quadro 3), não sendo possível a comparação entre os grupos.

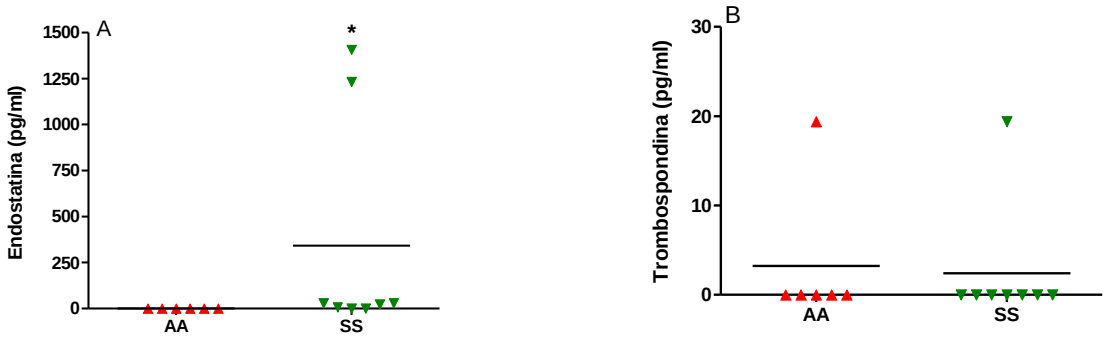

Figura 19: Análise do secretoma de fatores anti-angiogênicos no sobrenadante de plaquetas. Concentrações de A) endostatina e B) trombospondina-2 no sobrenadante de plaquetas isoladas ($5x10^4$ plaquetas/poço) de indivíduos saudáveis (AA) e pacientes com anemia falciforme (SS) incubadas por 20 horas. Resultados expressos como média. *P<0,05; comparado ao grupo controle AA, determinado por teste *Mann Whitney*.

2.2.8 AVALIAÇÃO DO PERFIL DE FATORES ANGIOGÊNICOS NO SOBRENADANTE DA CO-CULTURA DE PLAQUETAS E CÉLULAS ENDOTELIAIS (HUVEC).

A fim de avaliar se o sobrenadante da co-cultura de células endoteliais com plaquetas, de indivíduos controles ou de pacientes com AF, poderia exibir um perfil pró-angiogênico (Figura 20) ou anti-angiogênico (Figura 21), as células HUVECs foram mantidas em cultura por 20 horas, na presença ou ausência das plaquetas. O sobrenadante foi, então, coletado e submetido à quantificação de fatores envolvidos no processo angiogênico, por ensaio multiplex.

Os dados obtidos mostram que o sobrenadante da co-cultura de HUVECs e plaquetas de pacientes com AF possuem concentrações significativamente elevadas do fator de crescimento Angiopoitina- 1 (Figura 20A) e uma tendência de elevação das concentrações dos fatores de crescimento Angiogenina (Figura 20B), PDGF-AA (Figura 20E), PDGF BB

(Figura 20F) e de VEGF (Figura 20G), em comparação ao sobrenadante de células endoteliais em estado basal (na ausência de plaquetas). Também, foram encontradas, no sobrenadante da co-cultura de células HUVECs e plaquetas de indivíduos AA, concentrações significativamente elevadas do fator Angiogenina (Figura 20B), somadas a uma tendência de elevação dos fatores Angiopoitina 1 (Figura 20A) e PDGF AA (Figura 20G), quando comparadas ao grupo basal.

Diferentemente da situação anterior, em que não foi possível quantificar os fatores PIGF e PDGF BB, o sobrenadante da co-cultura de HUVECs e plaquetas apresentou concentrações dentro da capacidade de detecção do kit usado. As análises dos resultados mostram que, independentemente da condição testada (presença ou ausência de plaquetas), as concentrações encontradas do fator PIGF são similares (Figura 20D).

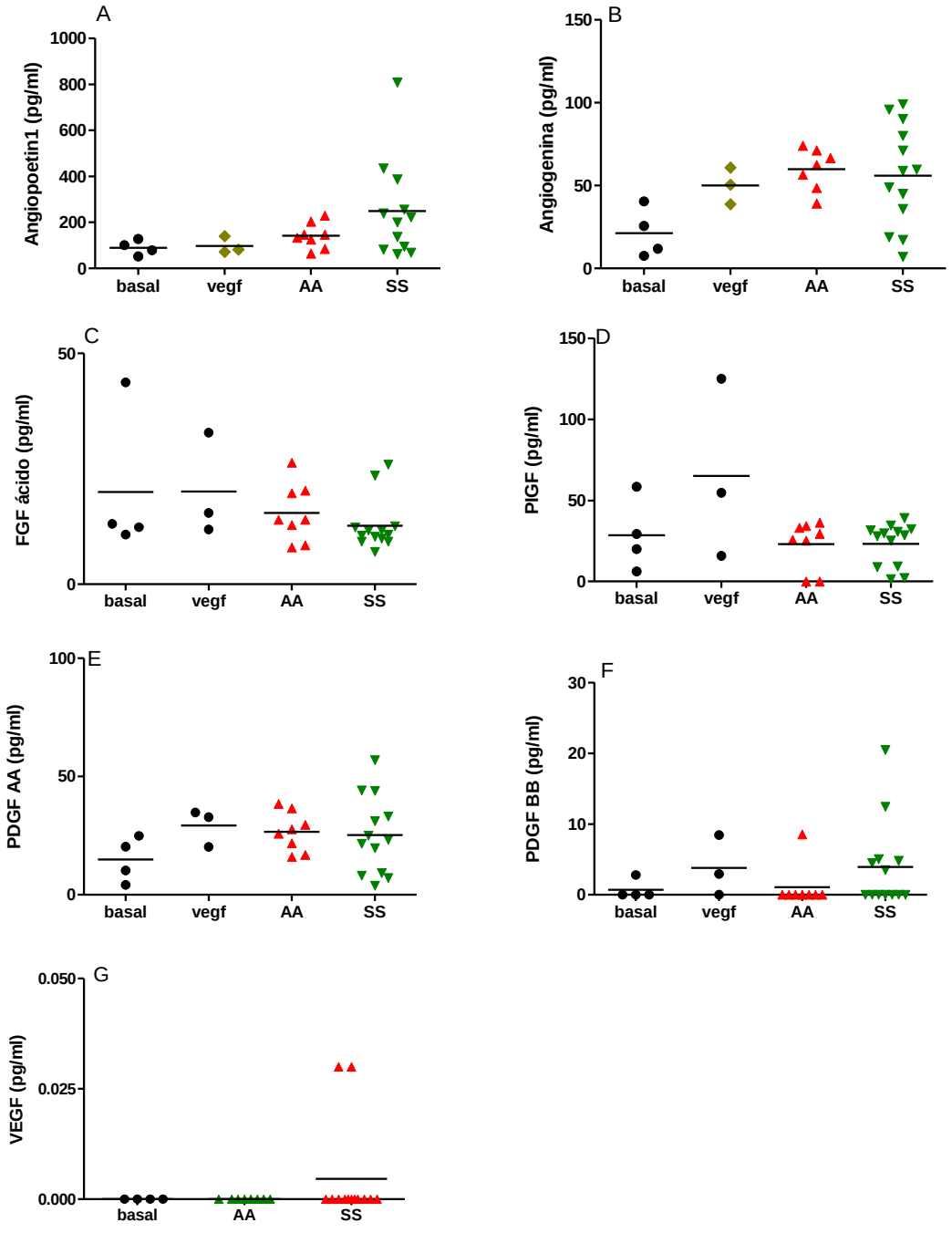

Figura 20: Análise do perfil de fatores pró-angiogênicos no sobrenadante da co-cultura de células HUVECs e plaquetas. Concentrações de: A) Angiopoitina 1, B) Angiogenina, C) Fator de crescimento derivado de fibroblastos, D) Fator de crescimento placentário, E) Fator de crescimento derivado de plaquetas AA, F) Fator de crescimento derivado de plaquetas BB, G) Fator de crescimento vascular, no sobrenadante da co-cultura de células endoteliais (HUVEC, $1x10^5$ células/ml) e plaquetas isoladas ($5x10^4$ plaquetas/poço), de indivíduos saudáveis (AA) e pacientes com anemia falciforme (SS). As HUVECs foram co-cultivadas com as plaquetas (20h, 37°C). O grupo basal foi cultivado nas mesmas condições (F12k, SFB 2%). O grupo de HUVEC incubadas com VEGF (10ng/ml) foi usado como controle positivo. Resultados expressos como média.Determinado por Kruskal Wallis, seguido pelo do teste de Dunn.

As concentrações dos fatores endostatina (Figura 21A) e trombospondina-2 (Figura 21B) nos sobrenadantes das co-culturas de plaquetas de indivíduos controles e AF com células endoteliais não diferiram estatisticamente

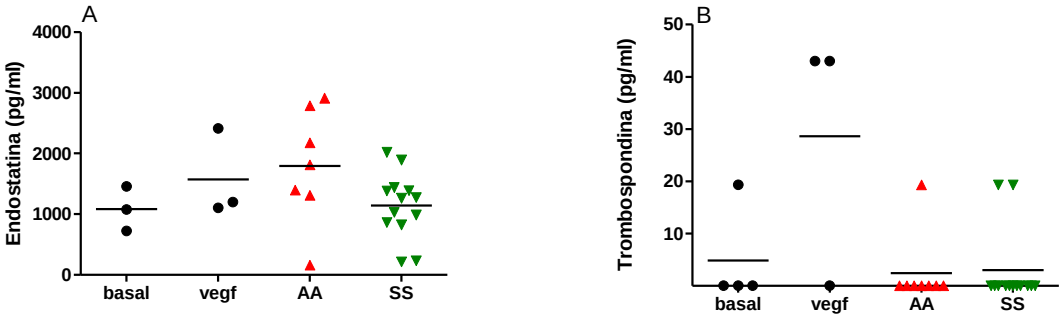

Figura 21: Análise do perfil de fatores anti-angiogênicos no sobrenadante da co-cultura de células HUVECs e plaquetas. Concentrações de A) endostatina e B) trombospondina-2 no sobrenadante da co-cultura de células endoteliais (HUVEC, $1x10^5$ células/ml) e plaquetas isoladas ($5x10^4$ plaquetas/poço) de indivíduos saudáveis (AA) e pacientes com anemia falciforme (SS). As HUVECs foram co-cultivadas com as plaquetas (20h, 37°C). O grupo basal foi cultivado nas mesmas condições (F12k 2%). O grupo de HUVEC cultivadas com VEGF (10ng/ml) foi usado como controle positivo. Resultados expressos como média. Determinado por Kruskal Wallis, seguido pelo do teste de Dunn.

6.3 PACIENTES COM DOENÇA FALCIFORME HbSC (SC)

6.3.1 COMPARAÇÃO DOS PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS.

A análise dos hemogramas demonstra que pacientes SC apresentam porcentagens reduzidas de hematócrito, concentrações significativamente reduzidas de hemoglobina e contagens elevadas de células brancas totais e plaquetas, em comparação ao grupo controle (Tabela 3).

Tabela 3: Comparação dos parâmetros hematimétricos de controles e pacientes com doença falciforme SC.

	AA	**SC**
N	**20**	**16**
Idade	**30 (30; 19-44)**	**36 (38; 24-56)**
Homens/ Mulheres	**9/ 11**	**8/8**
Células vermelhas totais (10^6 g/L)	5,0 (3,09; 3,1-5,9)	3,9 (4,1; 2,0- 5,0)
Hematócrito (%)	42,6 (43,1; 37,2-48,2)	** 29,7 (28,8; 20,4- 39,4)
Hemoglobina (g/dL)	14,7 (14,8; 12,8-17,3)	* 11,3 (11,8 6,8- 13,6)
Células brancas totais (x10^9/L)	5,8 (5,6; 3,9-6,9)	*** 10,4 (10,0; 6,9- 11,9)
Plaquetas (x10^9/L)	255,4 (255,0; 152,0- 430,0)	* 345,6 (350,0; 171,0-513,0)

Dados hematimétricos de indivíduos controles (AA) e pacientes com doença falciforme SC (SC). Os hemogramas foram realizados utilizando-se o Sistema de Hematologia 120 Advia (Bayer Diagnostics, Tarrytown, NY, EUA). Valores expressos em média (mediana; mínimo e máximo). *P<0,05; **P<0,01; ***P<0,001, comparado ao grupo AA, determinado pelo teste *Mann Whitney*.

6.3.2 AVALIAÇÃO DA ATIVAÇÃO PLAQUETÁRIA

Em referência a comparação dos perfis de ativação das plaquetas de indivíduos controles e de pacientes com HbSC, não foram encontradas diferenças na expressão (% e MIF) das moléculas P-selectina (Figura 22A e B) e CD41a (Subunidade α da integrina αIIbβ3; Figura 22C e D) e na ativação da integrina αIIbβ3 (avaliado por ligação do anticorpo PAC-1; Figura 22D e E).

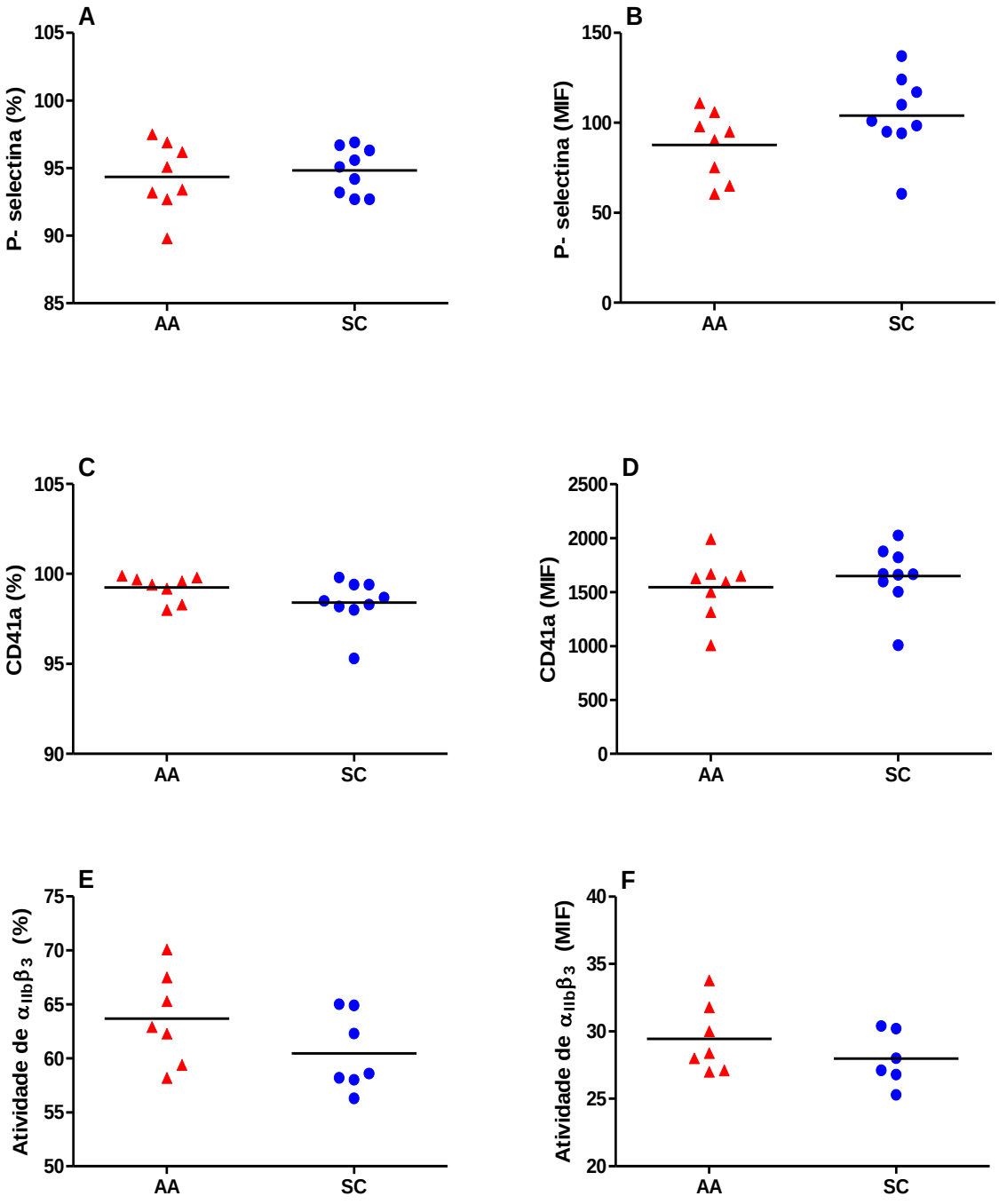

Figura 22: Expressão (% e MIF) das moléculas P-selectina e CD41a e da atividade de αIIbβ3 no PRP de pacientes com doença falciforme SC e indivíduos controles. A) % de expressão de P-selectina, B) média de intensidade de fluorescência de P-selectina, C) % de expressão de CD41a, D) média de intensidade de fluorescência de CD41a nas plaquetas. E) % de plaquetas apresentando a integrina αIIbβ3 na sua conformação ativada, F) média de intensidade de fluorescência da αIIbβ3 ativada. Expressões avaliados por citometria de fluxo do plasma rico em plaquetas (PRP, $1x10^6$ plaquetas/tubo) de indivíduos controle (AA, n=7) e pacientes com doença falciforme (SC, n=9). Resultados expressos como média. P>0,05, comparado ao grupo AA, determinado por teste de Mann Whitney.

Assim como observado no grupo de pacientes com AF (Figura 23D), os dados apontam para uma tendência de diminuição na expressão do receptor PAR-4 (Figura 23C e D) nas plaquetas dos pacientes HbSC, em comparação ao grupo controle.

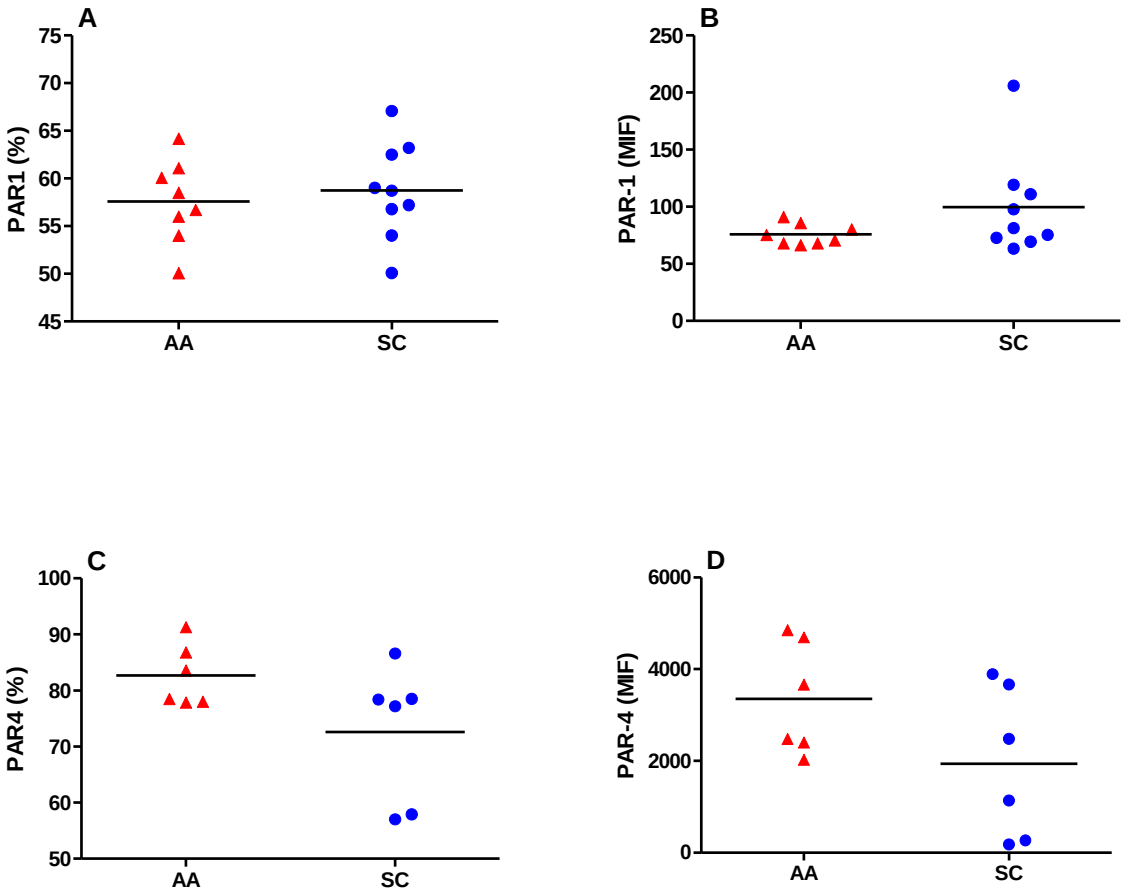

Figura 23: Expressão dos receptores de trombina na superfície de plaquetas de pacientes com doença falciforme SC e indivíduos controles. A) % de expressão de PAR-1, B) média de intensidade de fluorescência de PAR-1, C) % de expressão de PAR-4 e D) média de intensidade de fluorescência de PAR-4 nas plaquetas do plasma rico em plaquetas (PRP, $1x10^6$ plaquetas/tubo) de indivíduos controle (AA) e pacientes com doença falciforme SC (SC). Resultados expressos como média. Determinado por Kruskal Wallis, seguido pelo do teste de Dunn.

6.3.3 AVALIAÇÃO DA FORMAÇÃO DE ESTRUTURAS TIPO CAPILARES PELAS CÉLULAS ENDOTELIAIS NA PRESENÇA DE PLAQUETAS ISOLADAS DE INDIVIDUOS HbSC.

A análise dos nossos dados demonstra que plaquetas de indivíduos controles e pacientes SC são capazes de estimular, *in vitro*, a formação de estruturas capilares (Figura 24A), aumentar o número de extremidades (Figura 24B) e o número de malhas (Figura 24C), não havendo diferenças significantes entre os efeitos de plaquetas de indivíduos controles e HbSC.

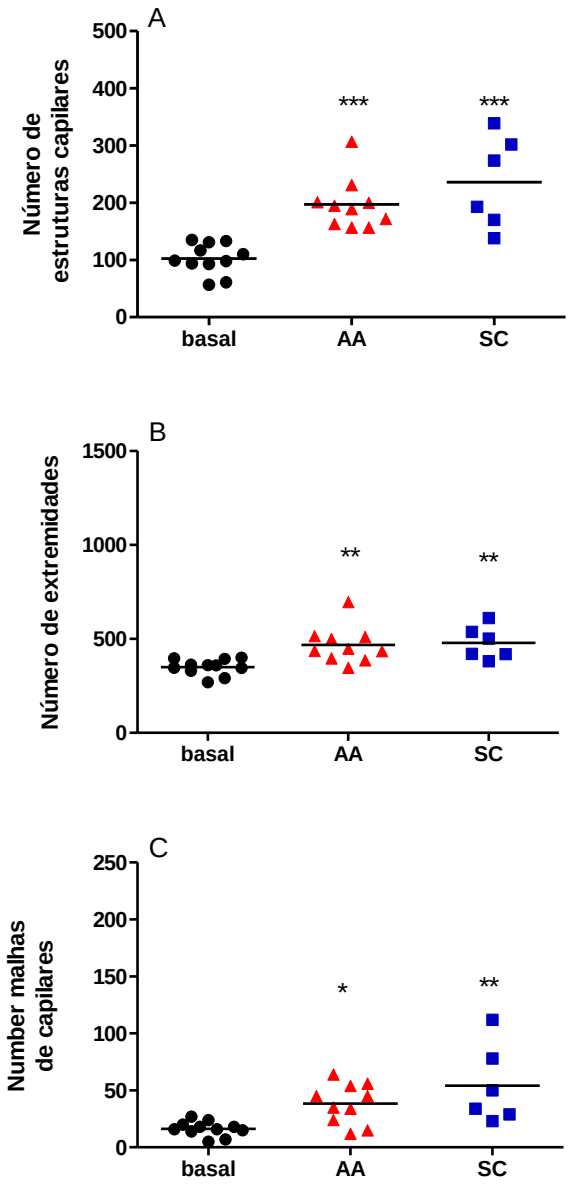

Figura 24: Quantificação das estruturas capilares de células HUVEC (5x10^3 células/poço) cultivadas com plaquetas isoladas (1x10^5 plaquetas/poço) de indivíduos saudáveis (AA; n=9) e pacientes com doença falciforme SC (SC; n=6). A) Número de estruturas capilares (ramos unidos por 2 pontos de ramificações). B) Número de pontos de ramificações (extremidades que se ramificam em um ou mais ramos). C) Número de malhas de capilares (loops). Resultados expressos como média. *P<0,05; **P<0,01 ***P<0,001, comparado ao basal, determinado por Kruskal Wallis, seguido pelo do teste de Dunn.

6.3.4 EFEITO DAS PLAQUETAS DE PACIENTES COM DOENÇA FALCIFORME SC NA VIABILIDADE E PROLIFERAÇÃO DAS CÉLULAS HUVEC.

A pesar do pequeno número amostral, os resultados não mostram diferenças significativas na viabilidade (Figura 25A) e proliferação celular (Figura 25B) das células endoteliais quando co-cultivadas com plaquetas de indivíduos controles e pacientes SC. Os dados foram comparados com o grupo basal (sem plaquetas).

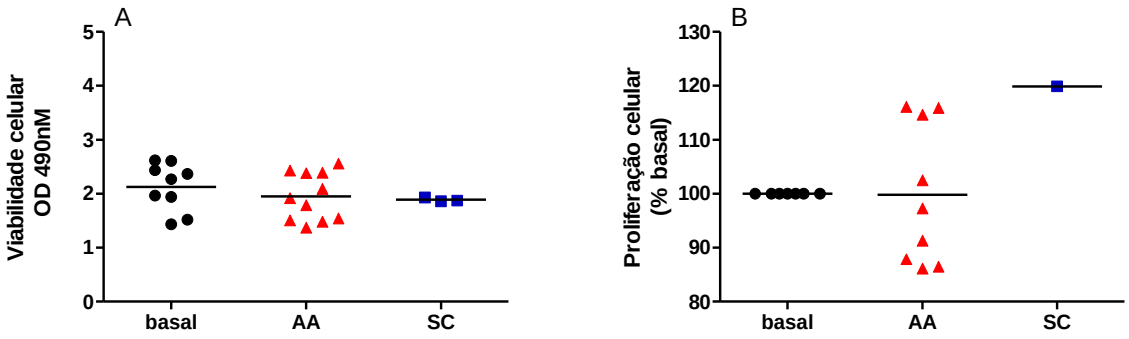

Figura 25: Avaliação do efeito das plaquetas (1x10^5 plaquetas/poço) de indivíduos controle (AA) e pacientes com doença falciforme SC nas células endoteliais. A) viabilidade das células endoteliais HUVEC, pela técnica de MTS e B) proliferação celular das células endoteliais, pela técnica de BrdU. HUVEC (1x10^4 células/poço) foram incubadas na presença de meio de cultura F12 K, suplementado com SFB 2% , grupo basal. Como controle positivo (CP) de morte celular, as células foram incubadas na ausência de meio de cultura e na presença de PBS. Cada barra representa a média. **P<0,01, comparado ao basal, determinado por Kruskal Wallis, seguido pelo do teste de Dunn**.**

6.3.5 AVALIAÇÃO DA INVASÃO E DA MIGRAÇÃO CELULAR DAS HUVECS NA PRESENÇA DE PLAQUETAS DE PACIENTES COM DOENÇA HbSC.

Os resultados apontam para uma tendência de aumento da capacidade de invasão (Figura 26A) e de migração (Figura 26B) das células endoteliais, quando co-cultivadas na presença de plaquetas de indivíduos controles e pacientes HbSC, em comparação as células cultivadas em estado basal.

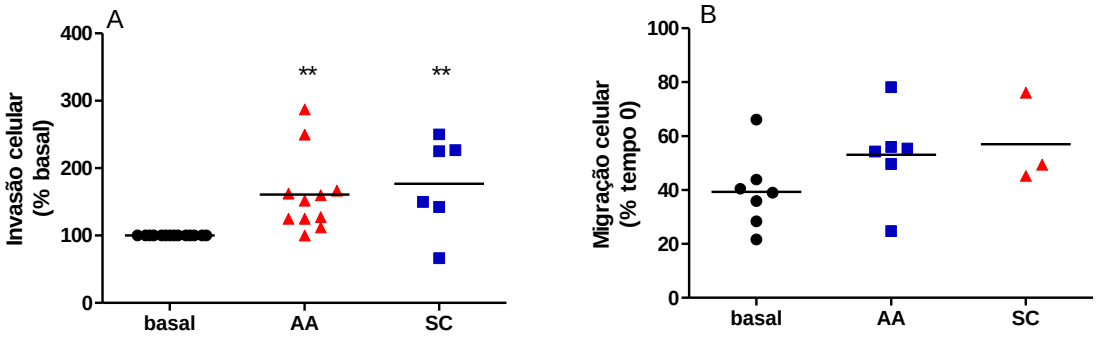

Figura 26: Avaliação da capacidade de invasão e migração de células endoteliais co-cultivadas com plaquetas isoladas de pacientes com doença falciforme SC e controles. A) invasão das células HUVEC ($2,5x10^3$ células/poço), em câmara dupla de Matrigel (condição I: HUVECs cultivadas no poço superior e as plaquetas no poço inferior) e B) migração das células HUVEC ($5x10^4$ células/poço), avaliada pela técnica de scratch, na presença de plaquetas isoladas de indivíduos controle (AA) e pacientes com doença falciforme SC (SC). Resultados expressos como média. **P<0,01, comparado ao basal, determinado por Kruskal Wallis, seguido pelo do teste de Dunn.

6.3.6 AVALIAÇÃO DO PERFIL ANGIOGÊNICO DO SOBRENADANTE DE PLAQUETAS DE PACIENTES COM DOENÇA FALCIFORME HbSC.

Buscando comparar o perfil de liberação de fatores angiogênicos secretados por plaquetas de controles e pacientes, as plaquetas isoladas de controle e pacientes HbSC foram cultivadas em meio F12Ki com 2% de SFB (o mesmo usado na condição de co-cultura com HUVECs) por 20 horas. Posteriormente, o sobrenadante da cultura foi coletado e usado para a quantificação de fatores que atuam como estimuladores da angiogênese e fatores que atuam como inibidores desse processo (Figuras 27 e 28).

Nossos achados apontam para uma tendência de elevação dos fatores estimuladores da angiogênese, angiogenina (Figura 27 B), PIGF (Figura 27 D) e PDGF-AA (Figura 27 E) no sobrenadante das plaquetas dos pacientes SC quando incubadas por 20 horas.

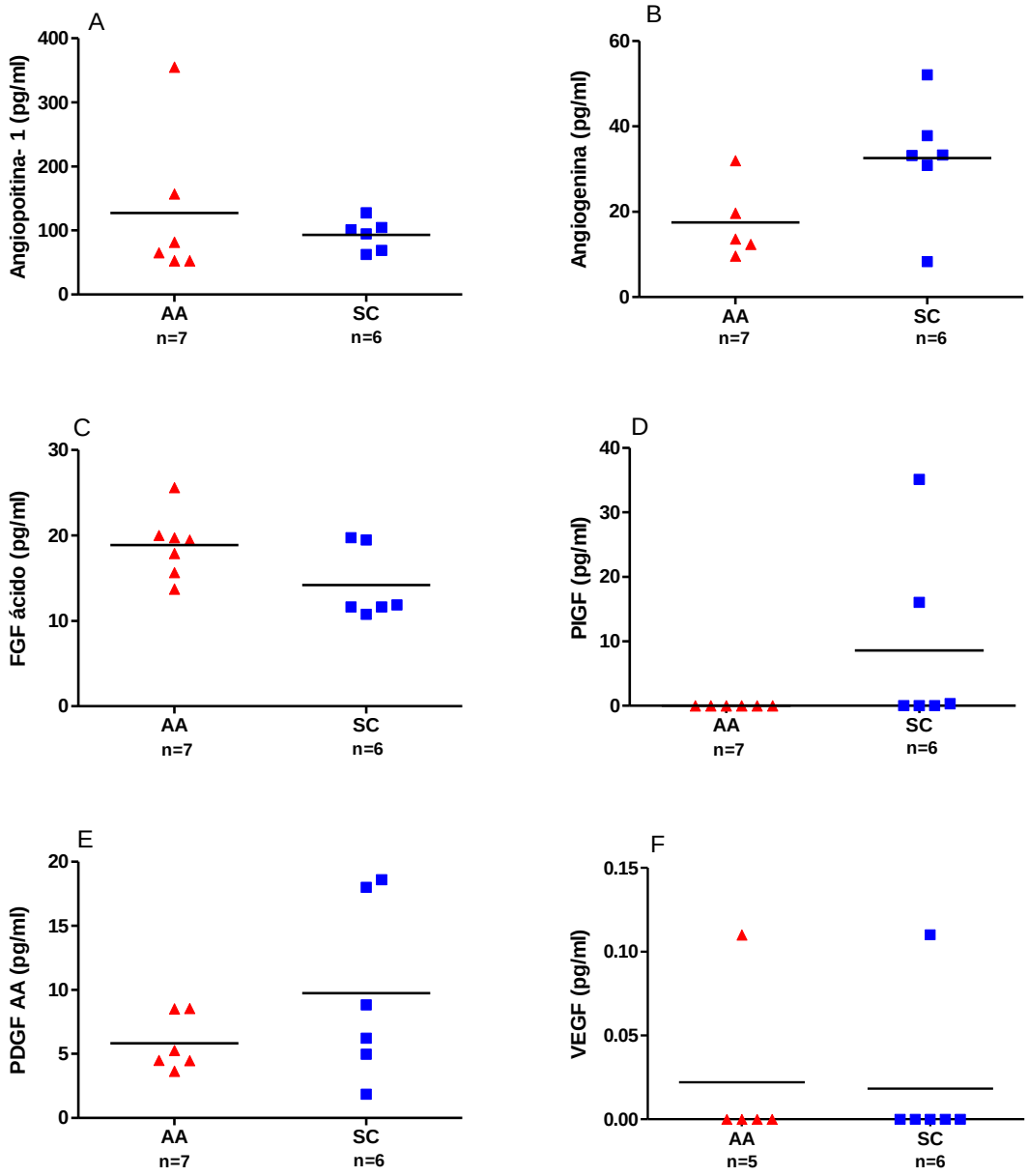

Figura 27: Análise do secretoma de fatores pró-angiogênico no sobrenadante de plaquetas isoladas de indivíduos controles e pacientes com doença falciforme SC. Concentrações de: A) Angiopoitina 1, B) Angiogeninca, C) fator de crescimento derivado de fibroblastos, D) fator de crescimento placentário, E) fator de crescimento derivado de plaquetas AA e F) fator de crescimento vascular, detectadas no sobrenadante de plaquetas isoladas ($5x10^4$ plaquetas/poço) de indivíduos saudáveis (AA) e pacientes com doença falciforme SC (SC) incubadas por 20 horas. Resultados expressos como média. Comparado ao grupo controle AA, determinado por teste de Mann Whitney.

Os resultados obtidos mostram que o sobrenadante das plaquetas de pacientes SC da coorte estudada possuem concentrações significativamente elevadas endostatina (Figura 28 A), quando comparado as plaquetas do grupo controle.

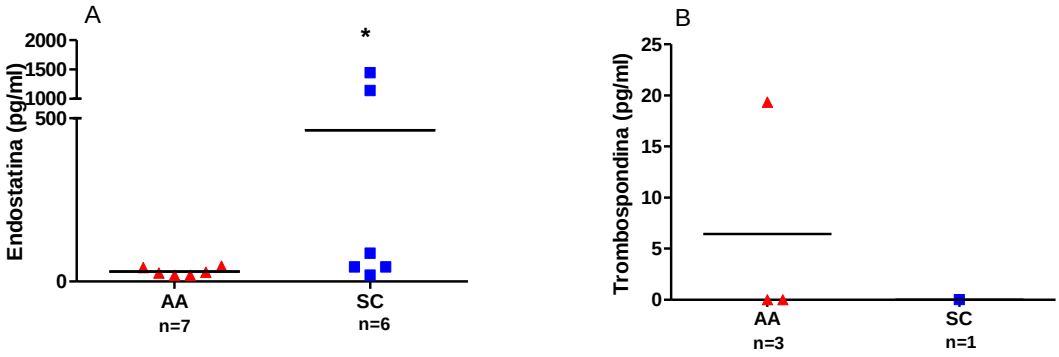

Figura 28: Análise do secretoma de fatores anti-angiogênicos no sobrenadante de plaquetas. Concentrações de A) endostatina e B) trombospondina-2 no sobrenadante de plaquetas isoladas ($5x10^4$ plaquetas/poço) de indivíduos saudáveis (AA) e pacientes com doença falciforme (SC) incubadas por 20 horas. Resultados expressos como média. *P<0,05; comparado ao grupo controle AA, determinado por teste Mann Whitney.

7. DISCUSSÃO

No indivíduo adulto, raramente formam-se novos vasos a partir de vasos pré-existentes (angiogênese), todavia, esse processo pode ocorrer em resposta a alterações na homeostase vascular (114-115). A angiogênese, quando descontrolada, pode favorecer o surgimento de várias situações patológicas como, retinopatia, artrite, psoríase e câncer (116-118), contudo, não se pode dizer que este processo é totalmente danoso, pois em algumas doenças e no contexto da cicatrização de feridas, a formação de novos rearranjos vasculares favorece a revascularização das áreas lesionadas, permitindo a reoxigenação tecidual (119). Já é descrito na literatura que a angiogênese é um dos componentes de doenças inflamatórias crônicas (103-104). Na DF, por exemplo, há indícios de que o estado pró-angiogênico possa estar diretamente ligado à isquemia tecidual e ao dano endotelial, condições frequentes nessa doença e que ocorrem em resultado da oclusão microvascular contínua, da hemólise intravascular crônica e do estresse oxidativo (121).

Um estudo do nosso grupo de pesquisa demonstrou que pacientes com AF e SC apresentam padrões angiogênicos distintos, e que o tratamento com hidroxiureia é capaz de diminuir as concentrações plasmáticas de fatores pró-angiogênicos em pacientes com AF (103). Em outro estudo, dados ofereceram indícios de que as plaquetas de pacientes com AF circulam em estado ativado e apresentam propriedades adesivas aumentadas (29). Há relatos de que a ativação plaquetária pode resultar na liberação de uma gama de fatores pró-angiogênicos, anti-angiogênicos, citocinas e outras moléculas pró-inflamatórias (75;122). Italiano e colaboradores (2008) demonstraram que fatores pró e anti-angiogênicos podem ser armazenados em grânulos alfa distintos e que a sua liberação ocorre mediante estímulos específicos do microambiente (88-89). Ainda se sabe pouco sobre a secreção dos fatores envolvidos na angiogênese pelas plaquetas, mas já está descrito que as plaquetas de pacientes com DF apresentam uma maior atividade e/ou expressão de suas moléculas de adesão e receptores (58). Vários estudos demonstraram que pacientes com DF exibem um perfil pró-trombótico crônico, com aumento da geração de trombina, além da exposição de fosfatilserina e CD40L (32). Diante disso, nos questionamos se as plaquetas da coorte de pacientes do nosso centro de pesquisa poderiam apresentar alterações na expressão e ativação de alguns receptores e

integrinas que são marcadores de ativação plaquetária e/ou diretamente envolvidos na liberação de fatores envolvidas na angiogênese.

Dentre as muitas proteínas presentes na superfície das plaquetas, pode-se destacar a P-selectina, uma molécula de adesão que, quando ativada, pode contribuir para a formação de agregados celulares de plaquetas e neutrófilos (126-127). Outra proteína bastante estudada é a integrina αIIbβ3, cuja o aumento da atividade pode favorecer a agregação plaquetária e a adesão de plaquetas ao endotélio (128). A participação das plaquetas na regulação das respostas inflamatórias da DF é evidente (102), no entanto, ainda não está claro porque a ativação plaquetária de indivíduos com DF é anormal (32). Neste presente estudo, inicialmente, esperava-se um aumento na expressão ou atividade de P-selectina, CD41a e αIIbβ3 (12,29,103) nos grupos de pacientes com AF e SC da nossa coorte, como previamente observado em 2014 pelo nosso grupo de pesquisa (29). Entretanto, a expressão dessas moléculas nas plaquetas dos pacientes avaliados nesse tudo não foi significativamente aumentada em relação aos controles. Embora ambos os estudos conduzidos pelo nosso grupo de pesquisa tenham sido realizados com pacientes em acompanhamento no ambulatório, o número de indivíduos em uso de HU aumentou consideravelmente nesse intervalo de sete anos. Atualmente, a maioria dos pacientes do nosso centro de pesquisa fazem uso de HU. Em 2019, um estudo mostrou que o uso da HU foi capaz de diminuir a expressão da P-selectina endotelial, reduzindo assim o estado pró-trombótico em pacientes com neoplasias mieloproliferativas (131). Com relação as plaquetas, ainda se sabe pouco sobre a ação da HU sobre o seu perfil de ativação.

Pacientes com AF exibem um aumento na atividade pró-coagulante e concentrações elevadas na geração de trombina (132). Os principais efeitos da trombina iniciam-se através da ativação de receptores ativados por proteases (PAR). A trombina é capaz de ativar os receptores PAR-1/PAR-3/PAR-4 e, embora esses receptores possam estar expressos em vários tipos celulares, como por exemplo no endotélio, nas plaquetas humanas são encontrados apenas os receptores PAR-1 e PAR-4 (133-134). Há relatos de que a estimulação específica de PAR-1 ou PAR-4 possa resultar na liberação seletiva do conteúdo dos grânulos alfas de plaquetas (88,89). Nossos achados demonstram que as expressões destes dois receptores podem estar alterados em pacientes com AF. As plaquetas de pacientes com AF da nossa

coorte apresentam aumento significativo na expressão do receptor PAR-1 e diminuição significativa na expressão de receptor PAR-4, em comparação com as plaquetas de indivíduos saudáveis. Embora não significativo, também foi possível observar uma tendência de diminuição na expressão de PAR-4 nas plaquetas de pacientes SC. Esses achados reforçam a hipótese de que as plaquetas de pacientes com DF apresentem uma liberação anormal de moléculas envolvidas na inflamação e angiogênese.

Para que a angiogênese ocorra, vários mecanismos e tipos celulares participam do processo. Os principais eventos envolvidos são a degradação da matrix extracelular, a proliferação das células endoteliais e a migração das células endoteliais (deslocamento). Posteriormente, ainda é necessário que ocorra a anastomose entre os vasos, com a incorporação de pericitos e células musculares (130). Para que cada uma das fases aconteça, uma série de fatores estimuladores ou inibidores do processo precisam atuar. Os fatores VEGF e PIGF, por exemplo, controlam a proliferação, morfogênese, migração e sobrevivência das células endoteliais (79), enquanto que o fator FGF estimula a secreção de mais VEGF e induz a formação do túbulo vascular (81). Os fatores ANG 1 e PDGF, por sua vez, atuam estimulando a maturação dos novos vasos (80,82). Já a endostatina e a trombospondina, inibem a migração e induzem a apoptose das células endoteliais, atuando assim, como inibidoras da angiogênese (84). Diferentes tipos celulares localizados próximos aos vasos que estão sendo formados liberam esses fatores, em resposta aos micros estímulos do ambiente. Há relatos na literatura de que alguns fatores angiogênicos possam estar relacionados com o surgimento de várias complicações da doença, como por exemplo a retinopatia proliferativa e a formação de úlceras de pernas (103, 105-106). Pacientes com AF podem apresentar concentrações significativamente elevadas dos fatores estimuladores da angiogênese, ANG 1, FGF, VEGF e PlGF, enquanto que, pacientes com a DF SC podem apresentar concentrações significativamente elevadas dos fatores pró-angiogênicos PIGF, VEGF e dos fatores anti-angiogênicos, endostatina e trombospondina (103). Também já foi mostrado que a estimulação do receptor de trombina PAR-1 nas plaquetas poderia resultar na liberação de fatores pró-angiogênicos, enquanto a estimulação do receptor de trombina PAR-4, resultaria na liberação de fatores anti-angiogênicos (88-89). Nosso grupo de pesquisa já demonstrou que existe uma correlação positiva e significativa entre o aumento plasmático dos fatores ANG-1, PDGFAA e a capacidade aumentada da mesma amostra em induzir a formação de estruturas do tipo capilar ou

induzir a invasão celular, ficando evidente que o plasma desses indivíduos atua como um potente indutor da neovascularização (103). Neste estudo, trazemos indícios de que as plaquetas de pacientes com AF secretam concentrações elevadas de ANG 1, angiogenina, PDGF AA e endostatina (99-103). Não foram encontradas concentrações elevadas dos fatores PIGF e VEGF no sobrenadante das plaquetas de pacientes com AF, como esperávamos. Contudo, não é possível afirmar que esses fatores não estão aumentados na AF ou que as plaquetas dos pacientes com AF não secretam esses fatores. É possível dizer, apenas, que não foi possível detectar esses fatores dentro do intervalo de detecção do kit usado. Também é importante ressaltar que, neste estudo, não utilizamos nenhum estímulo ativador para as plaquetas e que, na circulação sanguínea de pacientes com AF, existe uma gama de estímulos que podem fazer com que as plaquetas sejam ativadas e liberem o conteúdo de seus grânulos, o que poderia ser uma possível justificativa para as diferenças observadas no plasma sanguíneo e no sobrenadante de plaquetas de pacientes com AF. Além disso, embora não tenhamos usado o plasma sanguíneo no presente estudo, o perfil de secreção das plaquetas de nossos pacientes assemelhou-se com o perfil plasmático observado por Lopes e colaboradores (2015), no entanto, não encontramos grandes diferenças no secretoma de pacientes com AF e SC, o que pode ser devido ao pequeno número de amostras de pacientes SC obtidas.

Sabendo que a migração, proliferação e a formação de estruturas capilares de células endoteliais podem ser estimuladas por plaquetas (129) e que o secretoma das plaquetas de pacientes com AF, da nossa coorte de estudo, é diferente do perfil observado em indivíduos saudáveis, buscamos avaliar a capacidade dessas plaquetas estimularem as diferentes etapas da angiogênese. Os dados obtidos mostraram que sob as condições *in vitro* testadas, as plaquetas não diminuem a viabilidade das células endoteliais sendo, portanto, possível a utilização da co-cultura de plaquetas e HUVECs para ensaios de angiogênese. Não foram encontradas diferenças na proliferação celular das células endoteliais, induzidas por plaquetas de indivíduos controles e de pacientes com AF/SC. Ao avaliar a capacidade das plaquetas de estimularem a formação de estruturas tipo capilares em Matrigel, foi possível observar que as plaquetas de controles e pacientes com AF ou SC, de maneira geral, são capazes de aumentar de modo significativo à formação de estruturas capilares *in vitro*. Todavia, não foram encontradas diferenças entre os efeitos das plaquetas dos grupos de pacientes e controles nesta formação capilar. Em algumas imagens obtidas a partir da co-cultura de plaquetas

de pacientes com AF e células endoteliais, foi possível observar capilares mais frágeis e desorganizados, o que pode ser um indício de que a angiogênese na AF possa ter um padrão diferenciado e que mereça atenção. Já é conhecido que a HU pode contribuir para a redução da angiogênese na AF (103), contudo, neste estudo não foram encontradas diferenças na viabilidade e na capacidade de formar estruturas capilares, quando utilizamos as plaquetas isoladas de pacientes que estavam fazendo uso ou não de HU, o que pode ser um indício de que a ação dessa droga não por uma ação direta nas plaquetas.

Para que ocorra a formação do broto vascular, é necessário que as células se desloquem (migrem) para fora dos orifícios dissolvidos do vaso existente em direção ao local onde se formará um novo vaso. A capacidade migratória das células endoteliais requer a degradação da matriz extracelular e envolve a ativação de vários sinais endoteliais (85). Avaliamos, então, por duas metodologias diferentes, a capacidade de as plaquetas estimularem a migração das células endoteliais. Nossos resultados apontam para um aumento significativo na capacidade migratória das células endoteliais quando estas são co-cultivadas com plaquetas de controles e de pacientes com AF/SC, quando usamos a técnica de *scratch.* Também houve um aumento significativo na capacidade de invasão das células endoteliais co-cultivadas com plaquetas em um mesmo poço. Nossos dados sugerem, portanto, que as plaquetas de pacientes com AF, bem como as plaquetas de indivíduos controles, podem estimular a migração e a invasão das células endoteliais *in vitro.*

Além disso, embora todos os experimentos do nosso estudo tenham sido realizados utilizando-se a mesma concentração de plaquetas de indivíduos saudáveis e de pacientes, sabemos que a contagem de plaquetas na circulação de pacientes com DF é fisiologicamente superior ao número encontrado em indivíduos saudáveis. Nossa coorte de pacientes com AF e SC apresentou uma contagem 49% e 35% mais elevada na circulação, respectivamente, em relação ao grupo controle, número que pode ainda estar subestimado, uma vez que o estado ativado dessas plaquetas favorece sua interação com o endotélio. Ainda que alguns parâmetros plaquetários não sejam diferentes entre controles e pacientes, é possível que o número exacerbado de plaquetas, juntamente com fatores angiogênicos alterados, já seja suficiente para justificar um papel ainda mais relevante das plaquetas na angiogênese e, consequentemente, nas manifestações clínicas da DF. Nossos experimentos com concentrações mais ele-

vadas de plaquetas, que mostraram uma formação desorganizada das estruturas tipo capilares, podem ser um indicativo de que o número de plaquetas seja crucial para a ocorrência do processo angiogênico de maneira adequada.

Com este trabalho, podemos concluir que as plaquetas participam do processo angiogênico, não somente como reservatório de fatores angiogênicos, mas também estimulando a formação de estruturas capilares, a invasão e a migração celular. Embora não tenhamos encontrado grandes diferenças na ação exercida por plaquetas de indivíduos saudáveis e pacientes com DF, nossos dados oferecem indícios de que as plaquetas de pacientes com AF apresentam alterações na expressão dos receptores PARs e são capazes de liberar maiores quantidades de fatores angiogênicos, colaborando assim para o aumento da capacidade da formação de estruturas capilares *in vitro* e migração das células endoteliais. É provável que, em um contexto diferente do proposto para o presente estudo, com estímulos pró-inflamatórios, por exemplo, as plaquetas possam estimular ainda mais esse processo. Sendo assim, consideramos importante que mais estudos possam ser feitos para ampliar o conhecimento da importância das plaquetas no processo angiogênico como um todo, mas principalmente na DF.

8.CONCLUSÃO

✓ As plaquetas de pacientes HbSS/ HbSC e indivíduos saudáveis são capazes de estimular a formação de estruturas do tipo capilares por células endoteliais *in vitro*, de forma semelhante, quando co-cultivadas em Matrigel.

✓ A capacidade migratória *in vitro* das células endoteliais é aumentada quando são co-cultivadas com plaquetas de controles ou de pacientes com DF. Dados indicam que a proximidade (mesmo poço) entre as plaquetas de pacientes HbSS e as células endoteliais possa favorecer esse aumento.

✓ Em referência ao estímulo da proliferação celular das HUVEC, não foi possível encontrar diferenças no perfil dos efeitos de plaquetas de pacientes e controles, quando co-cultivadas nas condições propostas nesse estudo.

✓ Plaquetas de pacientes com AF secretam concentrações significativamente elevadas dos fatores pró-angiogênicos ANG 1, angiogenina e PDGF AA e do fator anti-angiogênico, endostatina.

✓ Pacientes com AF apresentam alterações na expressão de receptores PAR-1 e PAR-4, os quais podem estar envolvidos na secreção de fatores angiogênicos.

✓ Nosso trabalho reforça a hipótese que as plaquetas de pacientes com AF possam participar do processo angiogênico da AF. No entanto, é preciso lembrar que a fisiopatologia da DF é complexa e envolve uma série de eventos que podem contribuir ou não para o aumento da angiogênese. Diante disso, nossos dados abrem perspectivas para estudos futuros que possam explorar condições diferentes das que foram testadas neste estudo.

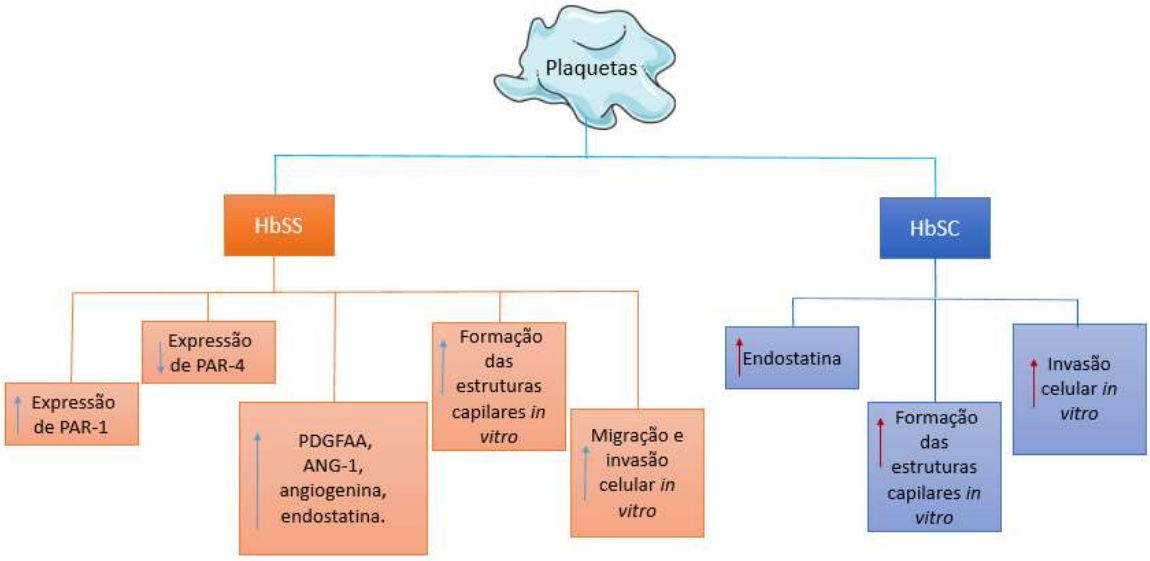

Figura 29: Resumo esquemático das conclusões obtidas no estudo. Dados comparados ao grupo controle (AA). HbSS (anemia falciforme) e HbSC (doença falciforme SC).

9.REFERÊNCIAS

1. Steinberg MH. Overview of sickle cell anemia pathophysiology In: Costa FF, Conran N, editors. Sickle cell anemia: From basic science to clinical practice. Switzerland: Springer International; 2016. p. 49–75
2. Ballas SK, Lewis CN, Noone AM, Krasnow SH, Kamarulzaman E, Burka ER. Clinical, hematological, and biochemical features of Hb SC disease. Am. J. Hematol. 1982, 13: 37-51.
3. Kato GJ, Piel FB, Reid CD, Gaston MH, Ohene-Frempong K, Krishnamurti L, Smith WR, Panepinto JA, Weatherall DJ, Costa FF, Vichinsky EP. Sickle Cell Disease. Nat Rev Dis Primers. 2018 Mar 15;4:18010.
4. Brasil. Ministério da Saúde. Portaria Conjunta nº 05, DE 19 DE FEVEREIRO DE 2018. Aprova o Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas da Doença Falciforme. Disponível: https://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2018/fevereiro/22/Portaria-Conjunta-PCDT-Doenca-Falciforme.fev.2018.pdf
5. Nath KA, Hebbel RP. Sickle cell disease: renal manifestations and mechanisms. Nat Rev Nephrol. 2015;11(3):161–71
6. Gladwin MT. Cardiovascular complications and risk of death in sickle-cell disease. Lancet. 2016 Jun 18;387(10037):2565-74.
7. Neumayr LD, Hoppe CC, Brown C. Sickle cell disease: current treatment and emerging therapies. Am J Manag Care. 2019 Nov;25(18 Suppl):S335-S343.
8. Costa FF and Fertrin KY. Clinical Manifestations and Treatment of Adult Sickle Cell Disease. 2016. 12: 285-319 In.: COSTA FF and CONRAN N. Sickle Cell Anemia. Springer.
9. Smith, C. M., Krivit, W., White, J. G. The irreversibly sickled cell. Am. J. Pediatr. Hematol. Oncol. 4, 307–315 (1982).
10. Conran N and Belcher JD. Inflammation in Sickle Cell Disease. Clin Hemorheol Microcirc 2018;68(2-3):263-299.

11. Parrow NL, Tu H, Nichols J, Violet PC, Pittman CA , Fitzhugh C, Fleming RE, Mohandas N, Tisdale JF, Levine M. Measurements of red cell deformability and hydration reflect HbF and HbA_2 in blood from patients with sickle cell anemia. Blood Cells Mol Dis 2017 Jun;65:41-50.
12. Dominical VM, Samsel L, Nichols JS, Costa FF, Mccoy JP Jr, Conran N, Kato GJ. Prominent role of platelets in the formation of circulating neutrophil-red cell heterocellular aggregates in sickle cell anemia. 2014; 99(11):e214-7.
13. Bennewitz MF, Jimenez MA, Vats R, Tutuncuoglu E, Jonassaint J, Kato GJ, Gladwin MT, Sundd P. Lung vasoocclusion in sickle cell disease mediated by arteriolar neutrophil-platelet microemboli. JCI Insight. 2017;2(1):e89761
14. Wandersee NJ, Hillery CA. Red blood cells and the vaso-occlusive process In: Costa FF, Conran N, editors. Sickle cell anemia: From basic science to clinical practice. New York: Springer Int; 2016. p. 49–74
15. Conran N. Intravascular hemolysis: a disease mechanism not to be ignored. Acta Haematol. 2014 ;132(1):97-9.
16. Kato GJ, Steinberg MH, Gladwin MT. Intravascular hemolysis and the pathophysiology of sickle cell disease. J Clin Invest. 2017 Mar 1; 127(3):750-760.
17. Rother RP, Bell L, Hillmen P, Gladwin MT. The clinical sequelae of intravascular hemolysis and extracellular plasma hemoglobin: a novel mechanism of human disease. JAMA. 2005;293(13):1653–1662.
18. Yalamanoglu A, Deuel JW, Hunt RC, Baek Jh, Hassell K, Redinius K, Irwin DC, Schaer DJ, Buehler PW. Depletion of haptoglobin and hemopexin promote hemoglobin-mediated lipoprotein oxidation in sickle cell disease. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 2018;315: L765-L774.
19. Mendonça R, Silveira AA, Conran N. Red cell DAMPs and inflammation. Inflamm Res 2016 Sep;65(9):665-78.
20. Allali S, Maciel TT, Hermine O, de Montalembert M. Innate immune cells, major protagonists of sickle cell disease pathophysiology. Haematologica. 2020;105 (2):273-283

21. Belcher JD, Nath KA, Vercellotti GM.Vasculotoxic and Proinflammatory Effects of Plasma Heme: Cell Signaling and Cytoprotective Responses. ISRN Oxidative Med. 2013; 2013:831596.
22. Belcher JD, Chen C, Nguyen J, Milbauer L, Abdulla F, Alayash AI, Smith A, Nath KA, Hebbel RP, Vercellotti GM. Heme triggers TLR4 signaling leading to endothelial cell activation and vaso-occlusion in murine sickle cell disease.Blood.2014;123:377-390.
23. Chen G, Zhang D, Fuchs TA, Manwani D, Wagner DD, Frenette PS. Heme-induced neutrophil extracellular traps contribute to the pathogenesis of sickle cell disease. Blood. 2014 Jun 12; 123(24):3818-27
24. Vallelian F, Schaer Ca, Deuel Jw, Ingoglia G, Humar R, Buehler Pw, Schaer Dj. Revisiting the putative role of heme as a trigger of inflammation. Pharmacol Res Perspect. 2018;6: e00392.
25. Vallelian F, Schaer Ca, Deuel Jw, Ingoglia G, Humar R, Buehler Pw, Schaer Dj. Revisiting the putative role of heme as a trigger of inflammation. Pharmacol Res Perspect. 2018;6: e00392.
26. Erdei J, Tóth A, Balogh E, Nyakundi BB, Bányai E, Ryffel B, Paragh G, Cordero Md, Jeney V. Induction of NLRP3 inflammasome activation by heme in human endothelial cells. Oxid Med Cell Longev. 2018;2018:4310816.
27. Silveira AAA, Mahon OR, Cunningham CC, Corr EM, Mendonça R, Saad STO, Costa FF, Dunne A, Conran N. S100A8 acts as an autocrine priming signal for heme-induced human Mϕ pro-inflammatory responses in hemolytic inflammation. J Leukoc Biol 2019 Jul;106(1):35-43.
28. Nader E, Romana M and Connes P. The Red Blood Cell—Inflammation Vicious Circle in Sickle Cell Disease. Front Immunol 2020 Mar 13;11:454.
29. Proença-Ferreira R, Brugnerotto AF, Garrido VT, Dominical VM, Vital DM, Ribeiro M de F, Dos Santos ME, Traina F, Olalla-Saad ST, Costa FF, Conran N.Endothelial activation by platelets from sickle cell anemia patients. PLoS One, 2014. 9(2): p. e89012.
30. Sparkenbaugh E, Pawlinski R. Prothrombotic aspects of sickle cell disease. J Thromb Haemost. 2017;15(7):1307-1316.

31. Rayes J, Bourne JH, Brill A, Watson SP. The dual role of platelet-innate immune cell interactions in thrombo-inflammation. Res Pract Thromb Haemost. 2020;4(1):23-35.
32. Conran N & De Paula EV. Thromboinflammatory mechanisms in sickle cell disease - challenging the hemostatic balance. Haematologica 2020 May 21;haematol.2019.239343.
33. Chweih H, Silva JAF, Ferreira Jr. WA, Brito PL, Gotardo EMF, Leonardo FC, Franco-Penteado CF, Costa FF, Conran N. Role for Platelets in Mediating Neutrophil Recruitment in TNF-α Induced Vaso-Occlusive Processes in Animals with Sickle Cell Anemia. Publish in 59th ASH Annual Meeting Abstracts · Blood 2017 130(Supplement 1):540.
34. Wun T, Brunson A. Sickle cell disease: an inherited thrombophilia. Am Soc Hematol Educ Program. 2016;2016:640–647.
35. Gremmel T, Frelinger AL, Michelson AD. Platelet Physiology. Seminars in Thrombosis & Hemostasis. 2016;42:191–204.
36. Schafer, A.; Eigenthaler, M.; Bauersachs, J. Platelet activation in heart failure. Clin Lab 2004, v. 50, n. 10, p. 559-66.
37. Semple J.W., Italiano J.E.Jr., And Freedman J. Platelets and the immune continuum. Nat. Rev. Immunol 2011. 11,264–274.
38. Eriksson O, Mohlin C, Nilson B.O, Ekdahl K.N. The Human Platelet as an Innate Immune Cell: Interactions Between Activated Platelets and the Complement System. Front. Immunol., 10 July 2019
39. Menter D.G, Tucker S.C, Kopetz S, Sood A.K, Crissman J.D, Honn K.V. Platelets and cancer:a casual or causal relationship: revisited.Cancer Metastasis Rev. 2014 Mar;33(1):231-69.
40. Zapata J.C, Cox D and Salvato M.S. The Role of Platelets in the Pathogenesis of Viral Hemorrhagic Fevers. PLoS Negl Trop Dis. 2014 Jun; 8(6): e2858.
41. Wojtukiewicz M.Z Sierko E, Hempel D, Tucker S.C, Honn K.V. Platelets and cancer angiogenesis nexus. Cancer Metastasis Rev. 2017 Jun;36(2):249-262
42. Mancuso ME, Santagostino E. Platelet "first responders" in wound response, cancer, and metastasis. Br J Haematol. 2017 Jul; 178(2):209-219

43. Menter DG, Kopetz S, Hawk E, Sood AK, Loree JM, Gresele P, Honn KV.Cancer Metastasis Rev. 2017 Jun;36(2):199-213.
44. Stassen, J. M.; Arnout, J.; Deckmyn, H. The hemostatic system. Curr Med Chem 2004, v. 11, n. 17, p. 2245-60.
45. Rivera F.J, Kazanis I, Ghevaert C, And Beyond A.L. Clotting: A Role of Platelets in CNS Repair? Front Cell Neurosci. 2016; 9: 511.
46. Thushara R.M, Hemshekhar M, Basappa, Kemparaju K, Rangappa K.S, Girish K.S. Biologicals, platelet apoptosis and human diseases: An outlook. Crit Rev Oncol Hematol. 2015 Mar;93(3):149-58.
47. Kral JB, Schrottmaier WC, Salzmann M, Assinger A. Platelet Interaction with Innate Immune Cells. Transfus Med Hemother. 2016; 43 (2): 78–88
48. Garrido VT, Sonzogni L, Mtatiro SN, Costa FF, Conran N, Thein SI. Association of plasma CD40L with acute chest syndrome in sickle cell anemia. Cytokine. 2017 Sep;97:104-107.
49. Garrido VT, Proença-Ferreira R, Dominical VM, Traina F, Bezerra MA, de Mello MR, Colella MP, Araújo AS, Saad ST, Costa FF, Conran N. Elevated plasma levels and platelet-associated expression of the pro-thrombotic and pro-inflammatory protein, TNFSF14 (LIGHT), in sickle cell disease. Br J Haematol. 2012 Sep;158(6):788-97.
50. Colella MP, de Paula EV, Machado-Neto JA, Conran N, Annichino-Bizzacchi JM, Costa FF, Olalla Saad ST, Traina F. Elevated hypercoagulability markers in hemoglobin SC disease. Haematologica. 2015 Apr;100(4):466-71.
51. Garcia F, Mendonça R, Miguel LI, Dominical VM, Saad STO, Costa FF, Conran N. $CXCR4^{hi}$ effector neutrophils in sickle cell anemia: potential role for elevated circulating serotonin (5-HT) in $CXCR4^{hi}$ neutrophil polarization. Sci Rep. 2020 Aug 31;10(1):14262.
52. Wagner, DD. & Frenette, PS. The Vessel Wall And Its Interactions. Blood 2008, 111, 5271–5281.
53. Francis R.B. Large-vessel occlusion in sickle cell disease: pathogenesis, clinical consequences, and therapeutic implications. Med Hypotheses 1991; 35:88-95.

54. Proença-Ferreira R, Brugnerotto AF, Garrido VT, Dominical VM, Vital DM, Ribeiro M de F, Dos Santos ME, Traina F, Olalla-Saad ST, Costa FF, Conran N.Endothelial activation by platelets from sickle cell anemia patients. PLoS One, 2014. 9(2): p. e89012.
55. Conran N & De Paula EV. Thromboinflammatory mechanisms in sickle cell disease - challenging the hemostatic balance. Haematologica 2020 May 21;haematol.2019.239343.
56. Proença-Ferreira R, Franco-Penteado CF, Traina F, Saad ST, Costa FF, Conran N. Increased adhesive properties of platelets in sickle cell disease: roles for IIb3-mediated ligant binding, diminished cAMP signaling and increased phosphodiesterase 3A activity. Br J Haematol 2010; 149, 280-88.
57. Helms CC, Marvel M, Zhao W, et al. Mechanisms of hemolysis-associated platelet activation. J Thromb Haemost. 2013;11(12):2148-2154.
58. Conran N & Rees DC. Prasugrel hydrochloride for the treatment of sickle cell disease. Expert Opin Investig Drugs. 2017 Jul;26(7):865-872.
59. Whelihan M.F, Lim M.Y, Mooberry M.J, Piegore M.G, Ilich A, Wogu A, Cai J, Monroe D.M, Ataga K.I, Mann K.G, Key N.S. Thrombin generation and cell-dependent hypercoagulability in sickle cell disease. J Thromb Haemost. 2016;14(10): 1941–52.
60. Murthy P, Durco F, Miller-Ocuin J.L, Takedai T, Shankar S, Liang X, Liu X, Cui X, Sachdev U, Rath D, Lotze Mt, Zeh Hj Rd, Gawaz M, Weber An, Vogel S.The NLRP3 inflammasome and Bruton's tyrosine kinase in platelets co-regulate platelet activation, aggregation, and in vitro thrombus formation. Biochem Biophys Res Commun. 2017;483(1):230-236.
61. Deng M, Guo H, Tam JW, Johnson BM, Brickey WJ, New JS, Lenox A, Shi H, Golenbock DT, Koller BH, McKinnon KP, Beutler B, Ting JP. Platelet-activating factor (PAF) mediates NLRP3-NEK7 inflammasome induction independently of PAFR. J Exp Med. 2019 Dec 2;216(12):2838-2853.
62. Vats R, Brzoska T, Bennewitz MF, Jimenez MA, Pradhan-Sundd T, Tutuncuoglu E, Jonassaint J, Gutierrez E, Watkins SC, Shiva S, Scott MJ, Morelli AE, Neal MD,

Kato GJ, Gladwin MT, Sundd P. Platelet Extracellular Vesicles Drive Inflammasome-IL-1β-Dependent Lung Injury in Sickle Cell Disease. Am J Respir Crit Care Med. 2020 Jan 1;201(1):33-46.

63. Stratman A.N, Davis G.E. Endothelial cell-pericyte interactions stimulate basement membrane matrix assembly: influence on vascular tube remodeling, maturation, and stabilization. Microsc. Microanal 2012. 18, 68-80
64. Carmeliet P and Jain R. Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. Nature. 2011 May 19; 473(7347): 298–307.
65. Peterson J.E , Zurakowski D, Italiano J.E Jr, Michel L.V, Fox L, Klement G.L, Folkman J. Normal ranges of angiogenesis regulatory proteins in human platelets. Am J Hematol. 2010.85(7):487-93.
66. Chen B,Sun H.H,Wang H.G,Kong H,Chen F.M, and Yu Q. The effects of human platelet lysate on dental pulp stem cells derived from impacted human third molars. Biomaterials 2012. 33,5023–5035.
67. Vogel S, Arora T, Wang X, Mendelsohn L, Nichols J, Allen D, Shet AS, Combs CA, Quezado ZMN, Thein SL. The platelet NLRP3 inflammasome is upregulated in sickle cell disease via HMGB1/TLR4 and Bruton tyrosine kinase. Blood Adv. 2018 Oct 23;2(20):2672-2680
68. Lugano R, Ramachandran M, Dimberg A. Tumor angiogenesis: causes, consequences, challenges and opportunities. Cell Mol Life Sci 2020 May;77(9):1745-1770.
69. Min Park K & Gerecht S. Harnessing developmental processes for vascular engineering and regeneration. Development 2014 Jul;141(14):2760-9.
70. Stratman A.N, Davis G.E. Endothelial cell-pericyte interactions stimulate basement membrane matrix assembly: influence on vascular tube remodeling, maturation, and stabilization. Microsc. Microanal 2012. 18, 68-80
71. Vogel S, Arora T, Wang X, Mendelsohn L, Nichols J, Allen D, Shet AS, Combs CA, Quezado ZMN, Thein SL. The platelet NLRP3 inflammasome is upregulated in sickle cell disease via HMGB1/TLR4 and Bruton tyrosine kinase. Blood Adv. 2018 Oct 23;2(20):2672-2680
72. Lugano R, Ramachandran M, Dimberg A. Tumor angiogenesis: causes, consequences, challenges and opportunities. Cell Mol Life Sci 2020 May;77(9):1745-1770.

73. Stephan Niland S., Eble .Ja. Integrin-Mediated Cell-Matrix Interaction in Physiological and Pathological Blood Vessel Formation. Journal of Oncology 2012, 125278, 25.
74. Min Park K & Gerecht S. Harnessing developmental processes for vascular engineering and regeneration. Development 2014 Jul;141(14):2760-9.
75. Oklu R,Walker T.G, Wicky S, Hesketh R. Angiogenesis and currentanti angiogenic strategies for the treatment of cancer. Vasc.Interv. Radiol 2010. 21, 1791–1805.
76. Nakano T, Ninomiya T, Sumiyoshi S, Onimaru M, Fujii H, Itabe H, Nakashima Y, Sueishi K, Tsuruya K, Oda Y, Kitazono T, Kiyohara Y. Chronic kidney disease is associated with neovascularization and intraplaque hemorrahage in coronary atherosclerosis in elders: results from the Hisayama Study. 2013. 84(2):373-80.
77. Corrêa Z.M.S, Eagle R.J.R. Pathological features of diabetic retinopathy. Arq Bras Oftalmol. 2005. 68(3):410-4
78. Martínez C.E, Smith P.C, Vap. The influence of platelet derived products on angiogenesis and tissue repair: a concise up date. Frontiers in Physiology 2015. v6; 290.
79. Klement G. L., Shai E., Varon D. (2013). The role of platelets in angiogenesis, in Platelets, ed Michelson A. D. (San Diego, CA: Elsevier;), 487–502.
80. Wilgus TA. Vascular Endothelial Growth Factor and Cutaneous Scarring. Adv Wound Care (New Rochelle). 2019 Dec 1;8(12):671-678.
81. Kardas G, Daszyńska-Kardas A, Marynowski M, Brząkalska O, Kuna P, Panek M. Role of Platelet-Derived Growth Factor (PDGF) in Asthma as an Immunoregulatory Factor Mediating Airway Remodeling and Possible Pharmacological Target. Front Pharmacol. 2020
82. Chen M, Bao L, Zhao M, Cao J, Zheng H. Progress in Research on the Role of FGF in the Formation and Treatment of Corneal Neovascularization. Front Pharmacol. 2020
83. Mesquita J, Castro-de-Sousa JP, Vaz-Pereira S, Neves A, Passarinha LA, Tomaz CT. Vascular endothelial growth factors and placenta growth factor in retinal vasculopathies: Current research and future perspectives. Cytokine Growth Factor Rev. 2018
84. Sheng J, Xu Z. Three decades of research on angiogenin: a review and perspective. .Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai). 2016.

85. Pandya, N.M.; Dhalla, N.S.; Santani, D.D. Angiogenesis - a new target for future therapy. Vascul Pharmacol., v. 44, n.5, p. 265-274, 2006.
86. Clapp C, Thebault S, Jeziorski MC, La Escalera GM. Peptide Hormone Regulation of Angiogenesis. Physiol Rev. 2009 Oct;89(4):1177-215.
87. Varner JA. The sticky truth about angiogenesis and thrombospondins. The Journal of Clinical Investigation 2006. v 116: 12
88. Italiano, J.E Jr, Richardson J.L, Patel-Hett S, Battinelli E, Zaslavsky A, Short S, Ryeom, Judah Folkman S, And Klement G.L. Angiogenesis is regulated by a novel mechanism: pro- and antiangiogenic proteins are organized into separate platelet α granules and differentially released. Blood. 2008 Feb 1; 111(3): 12
89. Chatterjee M, Huang Z, Zhang W, Jiang L, Hultenby K, Zhu L, et al. . Distinct platelet packaging, release, and surface expression of proangiogenic and antiangiogenic factors on different platelet stimuli. Blood (2011) 117:3907–11. 10.1182/blood-2010-12-327007
90. Battinelli EM, Markens BA, Italiano JE. Release of angiogenesis regulatory proteins from platelet alpha granules: modulation of physiologic and pathologic angiogenesis. Blood (2011) 118:1359–69. 10.1182/blood-2011-02-334524
91. Kamykowski J, Carlton P, Sehgal S, Storrie B. Quantitative immunofluorescence mapping reveals little functional coclustering of proteins within platelet alpha-granules. Blood. 2011;118(5):1370–3. Epub 2011/05/31. blood-2011-01-330910
92. Van Holten TC, Bleijerveld OB, Wijten P, de Groot PG, Heck AJ, Barendrecht AD, et al. Quantitative proteomics analysis reveals similar release profiles following specific PAR-1 or PAR-4 stimulation of platelets. Cardiovasc Res. 2014;103(1):140–6. 10.1093/cvr/cvu113
93. Miao X, Zhang W, Huang Z, Li N. Diabetes Mellitus despite a Marked Platelet Hyperreactivity. PLoS One. 2016; 11(9): e0162405
94. Huang Z, Miao X, Luan Y, Zhu L, Kong F, Lu Q, Pernow J, Nilsson G, Li N (2015) PAR1-stimulated platelet releasate promotes angiogenic activities of endothelial progenitor cells more potently than PAR4-stimulated platelet releasate. J Thromb Haemost 13: 465–476.

95. Andrawes NG, Ismail EA, Roshdy MM, Ebeid FSE, Eissa DS, Ibrahim AM. Angiopoietin-2 as a Marker of Retinopathy in Children and Adolescents With Sickle Cell Disease: Relation to Subclinical Atherosclerosis. J Pediatr Hematol Oncol. 2019 Jul;41(5):361-370.
96. Perelman N , Selvaraj S.K , Batra S , Sorte L.R , Erdreich-Epstein A , Coates T.D , Kalra V.K , Malik P .Placenta growth factor activates monocytes and correlates with sickle cell disease severity. Blood 2003.102(4):1506–1514.
97. Gu J.M, Yuan S, Sim D, Abe K, Liu P, Rosenbruch M, Bringmann P, Kauser K. Blockade of placental growth factor reduces vaso-occlusive complications in murine models of sickle cell disease. Exp Hematol. 2018 Apr;60:73-82.e3.
98. Nguyen VT, Nassar D, Batteux F, Raymond K, Tharaux PL, Aractingi S Delayed Healing of Sickle Cell Ulcers Is due to Impaired Angiogenesis and CXCL12 Secretion in Skin Wounds. .J Invest Dermatol. 2016 Feb;136(2):497-506.
99. Brittain JE, Hulkower B, Jones SK, Strayhorn D, De Castro L, Telen MJ, Orringer EP, Hinderliter A, Ataga KI. Placenta growth factor in sickle cell disease: association with hemolysis and inflammation. Blood 2010 Mar 11;115(10):2014-20.
100. Browne, P.V.; Mosher, D.F.; Steinberg, M.H.; Hebbel, R.P. Disturbance of plasma and platelet thrombospondin levels in sickle cell disease. Am. J. Hematol. 1996. 51,(4),296-301.
101. Duits A.J, Rodriguez T, Schnog J.J. Serum levels of angiogenic factors indicate a pro-angiogenic state in adults with sickle cell disease. Br J Haematol. 2006.134(1):116–119.
102. Andrawes NG, Ismail EA, Roshdy MM, Ebeid FSE, Eissa DS, Ibrahim AM. Angiopoietin-2 as a Marker of Retinopathy in Children and Adolescents With Sickle Cell Disease: Relation to Subclinical Atherosclerosis. J Pediatr Hematol Oncol. 2019 Jul;41(5):361-370.
103. Lopes F.C, Traina F, Almeida C.B, Leonardo F.C, Franco-Penteado C.F, Garrido V.T, Colella M.P, Soares R, Olalla-Saad S.T, Costa F.F, Conran N. Key endothelial cell angiogenic mechanisms are stimulated by the circulating milieu in sickle cell disease and attenuated by hydroxyurea. Haematologica. 2015. 100(6):730-9.

104. Lopes FC, Ferreira R, Albuquerque DM, Silveira AA, Costa R, Soares R, Costa FF, Conran N.. In vitro and in vivo anti-angiogenic effects of hydroxyurea.. Microvasc Res. 2014 Jul;94:106-13.

105. Antwi-Boasiako C, Frimpong E, Gyan B, Kyei-Baafour E, Sey F, Dzudzor B, Abdul-Rahman M, Dankwah GB, Otu KH, Ndanu TA, Campbell AD, Ekem I, Donkor ES. Elevated Proangiogenic Markers are Associated with Vascular Complications within Ghanaian Sickle Cell Disease Patients. Med Sci (Basel). 2018 Jun 27;6(3):53.

106. Park SY, Matte A, Jung Y, Ryu J, Anand WB, Han EY, Liu M, Carbone C, Melisi D, Nagasawa T, Locascio JJ, Lin CP, Silberstein LE, De Franceschi L.Pathologic angiogenesis in the bone marrow of humanized sickle cell mice is reversed by blood transfusion. Blood. 2020 Jun 4;135(23):2071-2084.

107. Meier ER Treatment Options for Sickle Cell Disease. Pediatr Clin North Am. 2018 Jun;65(3):427-443.

108. Torres L, Conran N. Emerging pharmacotherapeutic approaches for the management of sickle cell disease. Expert Opin Pharmacother. 2019 Feb;20(2):173-186.

109. Voskaridou E, Christoulas D, Bilalis A, Varvagiannis EPK, Stamatopoulos G, Sinopoulou K, Balassopoulou A, Loukopoulos D, Terpos E. The effect of prolonged administration of hydroxyurea on morbidity and mortality in adult patients with sickle cell syndromes: results of a 17-year, single-center Trial (LaSHS). BLOOD, 2010. V 115, N 12.

110. Gremmel T, Frelinger AL, Michelson AD. Platelet Physiology. Seminars in Thrombosis & Hemostasis. 2016;42:191–204.

111. Niihara Y, Miller St, Kanter J, Lanzkron S, Smith Wr, Hsu Ll, Gordeuk Vr, Viswanathan K, Sarnaik S, Osunkwo I, Guillaume E, Sadanandan S, Sieger L, Lasky Jl, Panosyan Eh, Blake Oa, New Tn, Bellevue R, Tran Lt, Razon Rl, Stark Cw, Neumayr Ld, Vichinsky Ep. Investigators of the Phase 3 Trial of I-Glutamine in Sickle Cell Disease. A phase 3 trial of l-glutamine in sickle cell disease. N Engl J Med 2018;379:226–35

112. Salinas Cisneros G, Thein SL. Recent Advances in the Treatment of Sickle Cell Disease. Front Physiol. 2020 May 20;11:435.

113. Kiran MS, Viji RI, Kumar SVB, Prabhakaran AA, Sudhakaran PR. Changes in expression of VE-cadherin and MMPs in endothelial cells: Implications for angiogenesis. Vascular Cell. 2011; 3(1):6

114. Potente M, Gerhardt H and Carmeliet P. Basic and Therapeutic Aspects of Angiogenesis. 2011, Cell 146, 873-887.
115. Lugano R, Ramachandran M, Dimberg A. Tumor angiogenesis: causes, consequences, challenges and opportunities. Cell Mol Life Sci. 2020 May;77(9):1745-1770.
116. Kubo Y, Ishikawa K, Mori K, Kobayashi Y, Nakama T, Arima M, Nakao S, Hisatomi T, Haruta M, Sonoda KH, Yoshida S. Periostin and tenascin-C interaction promotes angiogenesis in ischemic proliferative retinopathy. Sci Rep. 2020 Jun 9;10(1):9299.
117. Niu X, Han Q, Liu Y, Li J, Hou R, Li J, Zhang K. Psoriasis-associated angiogenesis is mediated by EDIL3. Microvasc Res. 2020 Nov;132:104056.
118. Viallard C, Larrivée B. Tumor angiogenesis and vascular normalization: alternative therapeutic targets. Angiogenesis. 2017 Nov;20(4):409-426.
119. Logsdon EA., Finley SD, Popel AS, Mac Gabhann F. A systems biology view of blood vessel growth and remodeling. J Cell Mol Med. 2014 Aug;18(8):1491-508.
120. Knod Jl, Crawford K, Dusing M, Collins Mh, Chernoguz A, Frischerj JS. Angiogenesis and Vascular Endothelial Growth FactorA Expression Associated with Inflammation in Pediatric Crohn's Disease. J Gastrointest Surg. 2016 Mar;20(3):624-30.
121. Van Beem RT, Verloop RE, Kleijer M, Noort WA, Loof N, Koolwijk P, Van der Schoot, Van Hinsbergh VWM, Zwaginga JJ. Blood outgrowth endothelial cells from cord blood and peripheral blood: angiogenesis-related characteristics in vitro. J Thromb Haemost. 2009 Jan;7(1):217-26.
122. De Palma M, Biziato D, Petrova Tv. Microenvironmental regulation of tumour angiogenesis. Nat Rev Cancer. 2017 Aug;17(8):457-474.
123. Burnouf T, Goubran Ha, Chou Ml, Devos D, Radosevic M. Platelet microparticles: detection and assessment of their paradoxical functional roles in disease and regenerative medicine. Blood Rev 2014;28:155-166.
124. Sun C, Sb, Cao Zw, Bei Jj, Chen Q, Zho Wb, Xu Xj, Zhou Z, Yu Zp, Hu HY. Up Regulated Expression of Matrix Metalloproteinases in Endothelial Cells Mediates Platelet Microvesicle- Induced Angiogenesis. Cell Physiol Biochem. 2017;41(6):2319-2332.
125. Kim Hk, Song Ks, Chung Jh, Lee Kr, Lee SN. Platelet microparticles induce angiogenesis in vitro. Br J Haematol 2004;124:376-384.

126. Sreeramkumar V, Adrover JM, Ballesteros I, Cuartero MI, Rossaint J, Bilbao I, Nácher M, Pitaval C, Radovanovic I, Fukui Y, McEver RP, Filippi MD, Lizasoain I, Ruiz-Cabello J, Zarbock A, Moro MA, Hidalgo A. Neutrophils scan for activated platelets to initiate inflammation. Science. 2014 Dec 5; 346(6214):1234-8.

127. Margaret F. Bennewitz, Maritza A. Jimenez, Ravi Vats, Egemen Tutuncuoglu, Jude Jonassaint, Gregory J. Kato, Mark T. Gladwin, Prithu Sundd. Lung vaso-occlusion in sickle cell disease mediated by arteriolar neutrophil-platelet microemboli. JCI Insight. 2017 Jan 12; 2(1): e89761.

128. Bledzka K, Smyth SS, and Plow EF. Integrin αIIbβ3.From Discovery to Efficacious Therapeutic Target. Circ Res. 2013 Apr 12; 112(8): 1189–1200.

129. Giusti I, Rughetti A, D'Ascenzo S, Millimaggi D, Pavan A, Dell'Orso L, Dolo V. Identification of an optimal concentration of platelet gel for promoting angiogenesis in human endothelial cells. Transfusion. 2009 Apr;49(4):771-8.

130. Rajabi M, Mousa SA. The Role of Angiogenesis in Cancer Treatment. Biomedicines. 2017 Jun 21;5(2).

131. Alexandre Guy A, Gourdou-Latyszenok V, Le Lay N, Peghaire C, Kilani B, Dias JV, Duplaa C, Renault MA, Denis C, Villeval JC, Boulaftali Y, Jandrot-Perrus M, Couffinhal T and James. Vascular endothelial cell expression of $JAK2^{V617F}$ is sufficient to promote a pro-thrombotic state due to increased P-selectin expression. Haematologica. 2019 Jan; 104(1): 70–81

132. Lizarralde-Iragorri MA, Shet AS. Sickle Cell Disease: A Paradigm for Venous Thrombosis Pathophysiology. Int J Mol Sci. 2020 Jul 25;21(15):5279.

133. Rodriguez BAT, Bhan A, Beswick A, Elwood PC, Niiranen TJ, Salomaa V; FinnGen Study, Trégouët DA, Morange PE, Civelek M, Ben-Shlomo Y, Schlaeger T, Chen MH, Johnson AD. A Platelet Function Modulator of Thrombin Activation Is Causally Linked to Cardiovascular Disease and Affects PAR4 Receptor Signaling. Am J Hum Genet. 2020 Aug 6;107(2):211-221.

134. Sparkenbaugh EM, Chen C, Brzoska T, et al. . Thrombin-mediated activation of PAR-1 contributes to microvascular stasis in mouse models of sickle cell disease. *Blood*. 2020.

135. Kisucka J, Butterfield CE, Duda DG, Eichenberger SC, Saffaripour S, Ware J, Ruggeri ZM, Jain RK, Folkman J, andWagner DD. Platelets and platelet adhesion support angiogenesis while preventing excessive hemorrhage. PNAS January 24, 2006 103 (4) 855-860

10. ANEXOS

10.1 AVALIAÇÃO DO PERFIL ANGIOGÊNICO DO SOBRENADANTE DA CO-CULTURA DE PLAQUETAS E CÉLULAS ENDOTELIAIS (HUVEC) NA PRESENÇA DE *INSERTS* DE *TRANSWELL.*

Adicionalmente, objetivamos determinar se o contato direto entre as células endoteliais e plaquetas é necessário para estimular a liberação de fatores envolvidos no processo angiogênico. Células HUVECs e plaquetas de indivíduos controles e pacientes HbSS, foram cultivadas na presença de *inserts* de *transwell* (barreira física), com poros de 0,4 µm, que não permitiam a passagem das plaquetas, mas que favoreciam o compartilhamento do meio. Após 20 horas, o sobrenadante foi então coletado e usado para quantificação de fatores estimuladores (Figura 27) e inibitórios (Figura 28) do processo angiogênico.

Não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos, e os valores encontrados no sobrenadante da co-cultura de plaquetas e HUVEC ficaram próximos aos encontrados no sobrenadantes das células em estado basal (Figura 27A- F). Os valores obtidos para a quantificação do fator de crescimento VEGF (Figura 27G), foram inferiores aos detectáveis pelo kit, não sendo possível a comparação entre os grupos.

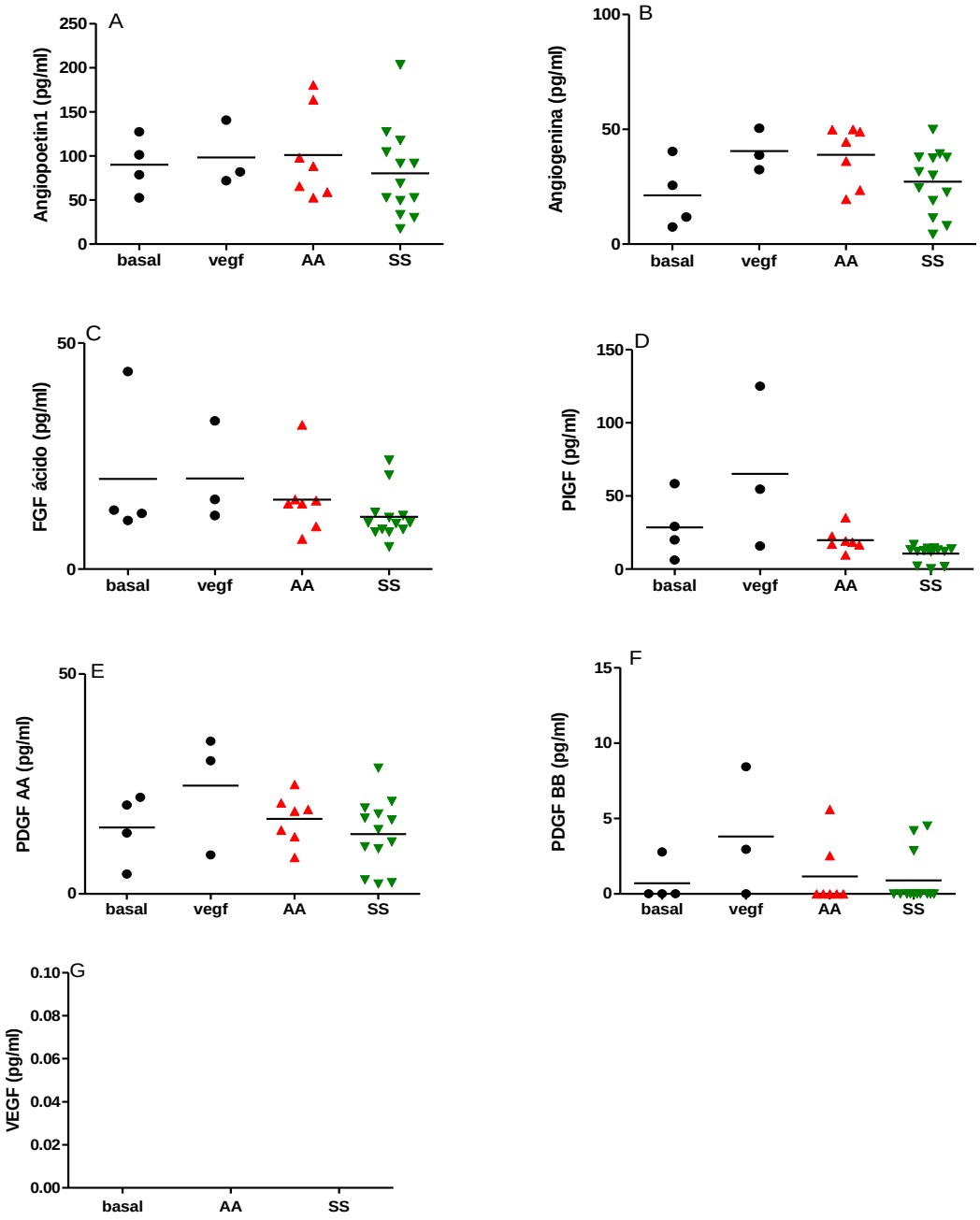

Figura 30: Análise do perfil pró-angiogênico do sobrenadante da co-cultura de células HUVECs e plaquetas, na presença de inserts de transwell. Concentrações de: A) Angiopoitina 1, B) Angiogenina , C) Fator de crescimento derivado de fibroblastos (FGF ácido), D) Fator de crescimento placentário (PIGF), E) Fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF BB), F) Fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF AA), e G) Fator de crescimento vascular (VEGF), quantificados no sobrenadante da co-cultura de células endoteliais (HUVEC, $1x10^5$ células/ml) e plaquetas isoladas ($5x10^4$ plaquetas/poço), de indivíduos saudáveis (AA) e pacientes com anemia falciforme (SS). As HUVECs foram co-cultivadas com as plaquetas (20h, 37°C). O grupo basal foi cultivado nas mesmas condições (F12k 2% SFB). O grupo VEGF (10ng/ml) foi usado como controle positivo. Resultados expressos como média . Resultados expressos como média. *P<0,05; comparado ao basal, determinado por Kruskal Wallis, seguido pelo do teste de Dunn.

Em relação aos fatores inibitórios do processo angiogênico, embora não significativo, foi possível observar uma tendência de elevação nas concentrações de endostatina (Figura 28A) e trombospondina (Figura 28 B) no sobrenadante da co-cultura de HUVECs e plaquetas AA, em comparação ao grupo basal.

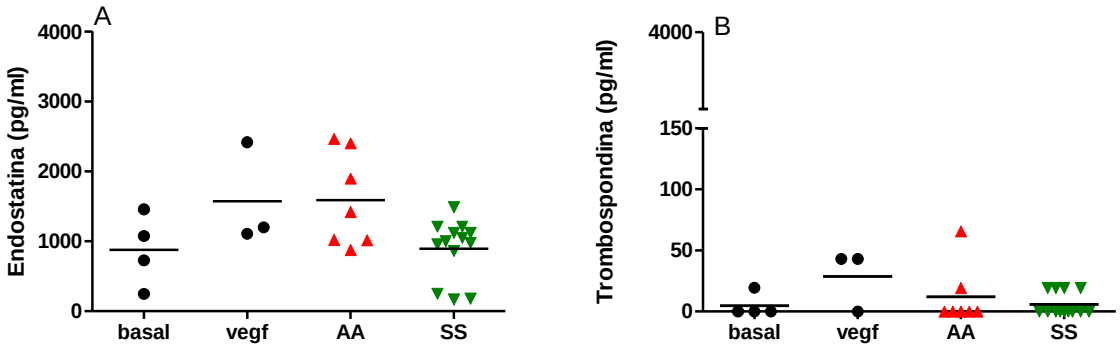

Figura 31: Análise do perfil anti-angiogênico do sobrenadante da co-cultura de células HUVECs e plaquetas, na presença de inserts de transwell. Concentrações de A) endostatina e B) trombospondina-2, quantificados no sobrenadante da co-cultura de células endoteliais (HUVEC, $1x10^5$ células/ml) e plaquetas isoladas ($5x10^4$ plaquetas/poço), de indivíduos saudáveis (AA) e pacientes com anemia falciforme (SS). As HUVECs foram co-cultivadas com as plaquetas (20h, 37°C). O grupo basal foi cultivado nas mesmas condições (F12k 2% SFB). O grupo VEGF (10ng/ml) foi usado como controle positivo. Resultados expressos como média. *P<0,05; comparado ao basal, determinado por *Kruskal Wallis*, seguido pelo do teste de *Dunn*.

10.2 AVALIAÇÂO do PAPEL DAS PLAQUETAS NA ANGIOGENESE DE CAMUNDONGOS TRANSGENICOS COM DOENÇA FALCIFORME

10.2.1 QUANTIFICAÇÃO DE HEMOGLOBINA LIVRE

10.2.1.1 JUSTIFICATIVA

Das numerosas complicações clínicas de pacientes com DF (HbSS/HbSC), algumas podem ser associadas ao desequilíbrio de processos angiogênicos, como por exemplo a úlcera de perna ou a retinopatia proliferativa. Sabendo que as plaquetas de pacientes podem secretar fatores envolvidos nesse processo, procuramos entender o papel das plaquetas nos processos angiogênicos em camundongos transgênicos com DF. Buscando confirmar a hipótese levantada e avaliar o perfil de neovascularização diante de um cenário em que as pla-

quetas não estejam presentes, camundongos Townes foram tratados com um anticorpo depletor de plaquetas, (anti-C42b). Atualmente, existem dois modelos murinos transgênicos de DF disponíveis e amplamente utilizados em estudos in vivo da doença: as linhagens Townes (Hba<tm1(HBA)Tow> Hbb<tm2(HBG1,HBB*)Tow>/Hbb<tm3(HBG1,HBB)Tow>/J) e Berkeley. Em ambos os modelos, a HbS é expressa em homozigose e o fenótipo clássico da AF está presente. A escolha de camundongos Townes para esse estudo justifica-se pela maior sobrevida da linhagem Townes em relação à linhagem Berkeley Como controles, utilizamos camundongos C57BL/6Junib.

10.2.1.2 METODOLOGIA

Os animais foram divididos em grupos: I) C57BL/6 tratados com salina (n=3); II) C57BL/6 tratados com VEGF (n=4); III) Townes tratados com salina (n=3); IV) Townes tratados com IgG não especifico (n=4), V) Townes tratados com anti-C42b (anticorpo policlonal rato *anti-mouse GPIb – Emfret analytics*, n=2); VI) Townes tratados com VEGF (n=5). Para a escolha da concentração usada do anticorpo anti-CD42b foi realizada uma curva de dosagem. O uso de animais e a metodologia usada nesse estudo foram submetidas e aprovadas pelo comitê de ética animal da Universidade Estadual de Campinas (protocolo 5582-1/2020). Todos os animais utilizados no estudo são provenientes do Centro Multidisciplinar para investigação biológica na área da ciência em animais em laboratório (CEMIB) da Unicamp.

- **Ensaio de angiogênese *in vivo***

Uma mistura de Matrigel® e heparina, com ou sem VEGF (controle positivo), foi inoculada via subcutânea no dorsal de camundongos C57BL/6 (controle) e animais com AF Townes. No mesmo dia e após 72 horas da inoculação (Figura 29), os animais foram tratados com injeções com salina (60 µL; controle negativo); o anticorpo depletor de plaquetas (anti-C42b; na concentração de 1µg/g); IgG não específico (grupo controle), por via intravenosa pelo plexo ocular. Após 7 dias, os animais foram anestesiados e submetidos a uma pequena cirurgia para extração do *plug* de Matrigel, o qual foi pesado e fotografado. A quantificação da hemoglobina foi feita através do método de *Drabkins*, por colorimetria.

Figura 32:Desenho experimental usado para o tratamento dos animais.

10.2.1.3 RESULTADOS

Nos animais controles (C57BL/6) em que o *plug* de Matrigel foi tratado com VEGF, observa-se um aumento na concentração de hemoglobina, indicando a ocorrência da neovascularização. Contudo, quando olhamos para os efeitos do VEGF no plug de Matrigel dos animais com AF (Townes), esse aumento é inferior ao observado nos animais controles. Nos animais AF, houve um aumento na concentração de hemoglobina no *plug* dos animais tratados com o depletor de plaquetas (anti-CD42b), quando comparado aos demais animais AF que receberam apenas o tratamento com solução salina ou IgG (Figura 30).

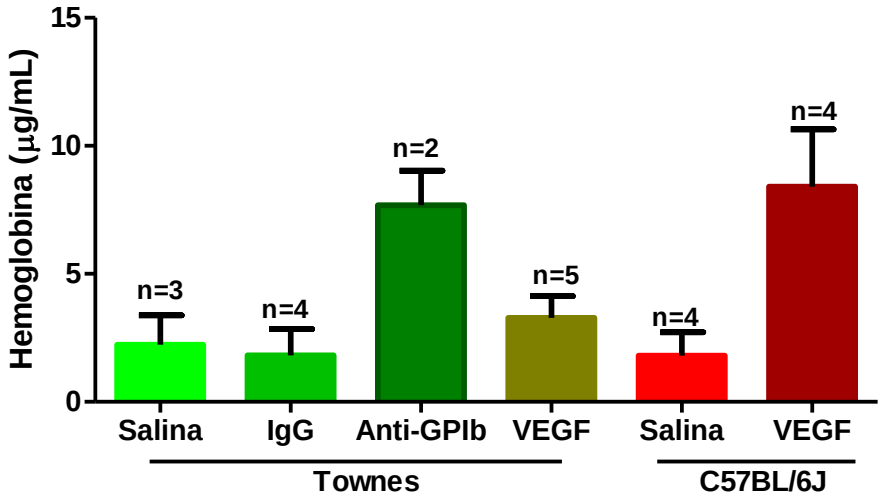

Figura 33: Neovascularização do plug de matrigel em camundongos C57BL/6J e animais Townes. Quantificações de hemoglobina em plug de matrigel foram feitos pelo método de Drabkins**.** Hemoglobina livre quantificada em *plugs* inoculados em camundongos controles (C57BL/6Junib) e falciforme (Townes). Resultados expressos como média e erro padrão. Anti-GPIb; anti-CD42b.

10.2.1.4 DISCUSSÃO/CONCLUSÃO

Esperávamos verificar uma quantidade maior de hemoglobina, indicativa de uma neovascularização maior, nos *plugs* de Matrigel provenientes dos camundongos Townes, comparados com os *plugs* de camundongos controles. Adicionalmente, esperávamos ver uma inibição desta neovascularização nos *plugs* de animais Townes tratados com anti-CD42b, um depletor de plaquetas. No entanto, observamos um aumento de hemoglobina nos *plugs* de Matrigel dos animais Townes tratados com anti-CD42b. Com base na análise dos dados obtidos, levantou-se a hipótese de que a depleção das plaquetas possa ter resultado em um processo hemorrágico (hemólise e sangramento), o que consequentemente levaria a um aumento da concentração de hemoglobina nesses animais, interferindo assim no resultado final. Kisucka e colaboradores forneceram indícios de que as plaquetas podem apoiar a angiogênese ao evitar que eventos hemorrágicos ocorram. Neste mesmo estudo, através do uso de um modelo de angiogênese *in vivo*, observou-se que a diminuição das plaquetas resulta na diminuição da formação de estruturas capilares (135). Diante desse cenário seria necessário rever o modelo experimental proposto, para garantir a robustez dos achados.