



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS

LETÍCIA QUEIROZ DA SILVA

**CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DE CÉLULAS
ENDOTELIAIS FORMADORAS DE COLÔNIA (CEFCS) EM PACIENTES COM
TROMBOSE VENOSA PROFUNDA AGUDA**

CAMPINAS

2022

LETÍCIA QUEIROZ DA SILVA

**CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DE CÉLULAS
ENDOTELIAIS FORMADORAS DE COLÔNIA (CEFCS) EM PACIENTES COM
TROMBOSE VENOSA PROFUNDA AGUDA**

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. JOYCE MARIA ANNICHINO BIZZACCHI

ESTE TRABALHO CORRESPONDE À VERSÃO
FINAL DA TESE DEFENDIDA PELA ALUNA LETÍCIA
QUEIROZ DA SILVA, E ORIENTADA PELA PROFA.
DRA. JOYCE MARIA ANNICHINO BIZZACCHI

CAMPINAS

2022

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas
Ana Paula de Moraes e Oliveira - CRB 8/8985

Si381c Silva, Leticia Queiroz da, 1994-
Caracterização e avaliação da atividade de células endoteliais formadoras de colônia (CEFCs) em pacientes com trombose venosa profunda aguda / Leticia Queiroz da Silva. – Campinas, SP : [s.n.], 2022.

Orientador: Joyce Maria Annichino Bizzacchi.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Disfunção endotelial. 2. Trombose venosa profunda. 3. Células endoteliais. I. Bizzacchi, Joyce Maria Annichino, 1957-. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: The role of endothelial colony-forming cells (ECFCs) in acute deep vein thrombosis patients

Palavras-chave em inglês:

Endothelial dysfunction

Deep vein thrombosis

Endothelial cells

Área de concentração: Fisiopatologia Médica

Titulação: Doutora em Ciências

Banca examinadora:

Joyce Maria Annichino Bizzacchi [Orientador]

Bruno Kosa Lino Duarte

Erich Vinicius de Paula

Luciana Pereira Ruas

Carolina Caliarí Oliveira

Data de defesa: 26-04-2022

Programa de Pós-Graduação: Fisiopatologia Médica

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

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0003-1632-4678>

- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/1995054347227582>

COMISSÃO EXAMINADORA DA DEFESA DE DOUTORADO

LETÍCIA QUEIROZ DA SILVA

ORIENTADORA: JOYCE MARIA ANNICHINO BIZZACCHI

MEMBROS TITULARES:

- 1. PROFA. DRA. JOYCE MARIA ANNICHINO BIZZACCHI**
- 2. PROF. DR. BRUNO KOSA LINO DUARTE**
- 3. PROF. DR. ERICH VINICIUS DE PAULA**
- 4. PROFA. DRA. CAROLINA CALIARI OLIVEIRA**
- 5. PROFA. DRA. LUCIANA PEREIRA RUAS**

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: 26/04/2022

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais, em especial
minha mãe e um sonho da caveira com os olhos
de diamantes.

EPÍGRAFE

“Cada vez que você faz uma opção está transformando sua essência em alguma coisa um pouco diferente do que era antes”

C.S. Lewis

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de dizer que este trabalho foi o maior desafio da minha vida e com toda certeza eu não teria conseguido sem a ajuda de muitas pessoas, aos quais quero agradecer abaixo.

Meus pais Elaine e Claudemir, que sempre foram pais muito presentes na minha vida e me presentearam com muitos conselhos sábios. Aqueles que vibram com minhas conquistas!

Em especial meu noivo Amauri, que compartilhou comigo todo o processo do doutorado, sendo uma fortaleza e me apoiando em exatamente todos os sentidos. Muito obrigada por sua paciência, pelas discussões científicas, por todas as caronas e finais de semana comigo no laboratório.

Aos meus sogros Amauri e Adriana e cunhadas Ana Júlia e Ana Celine, agradeço o incentivo e as palavras de carinho. Bem como a vó Maria Alice e a prima Maria Fernanda.

A minha orientadora e professora Joyce, que me recebeu de braços abertos em seu laboratório desde a minha iniciação científica. Uma grande mentora, que sempre acreditou nas minhas ideias e propostas.

A Silmara, que além de ser uma grande amiga é uma grande supervisora e me ajudou muito no doutorado. Obrigada por nossas conversas.

Ao professor Dr. Reinhold Medina na universidade Queens em Belfast/Irlanda do Norte que me recebeu em seu laboratório, e assim como sua equipe (em especial Edoardo, Elisa, Pietro, Daniel, Kiran e Varum), me proporcionaram acolhimento e aprendizado.

Aos meus amigos e colegas de laboratório do Hemocentro em geral, que prestaram alguma ajuda desde emprestar um reagente até dar um ombro amigo, ou um abraço apertado. Em especial, Stephany, Sandra, Melissa, Bruna Manzini, Lilian, Márcio, Thaizy, Ana Paula, Carmen, Marina Dorigatti e Jéssica Oliveira. Obrigada pelas conversas, cafés, almoços e risadas.

Aos médicos que me ajudaram nessa empreitada de captação de pacientes com trombose na fase aguda, em particular doutores Arlindo, Márcia, Otacílio e Stefano.

Aos funcionários Paulo e Diego da informática (houve muitas perdas de dados rsrrsr); as enfermeiras da coleta de sangue Mari, Gi, Karlinha, Su, Bete e Deva; a técnica de citometria de fluxo Irene; as meninas do lab de rotinas hematológicas (Bruna, Lili e Janet); e ao pessoal da esterilização de materiais (Júlio, Cecília, Silvia, Tai e Vanessa).

Agradeço também a Carol Lanaro, Priscila Boyano, e Sueli Costa, obrigada pelas dicas de cultura celular e por todo conhecimento compartilhado. Estabelecer uma sala de cultura sozinha não foi fácil e eu agradeço muito a ajuda.

E por fim, aqueles que fizeram o trabalho acontecer, os indivíduos saudáveis e os pacientes que doaram voluntariamente seu sangue, por mais de uma vez. Muito obrigada!

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior- Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001 e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) processos nº 2018/15618-3 e 2016/14172-6. Agradeço as agências de fomento.

RESUMO

A Trombose Venosa Profunda (TVP) é definida como um processo patológico resultante da alteração da parede do vaso, do fluxo sanguíneo, e/ou da composição sanguínea, o que leva à formação de um trombo dentro do vaso. Apesar do conhecimento atual, ainda há muito a se avançar no conhecimento dos fatores de risco associados à TVP. O endotélio vascular ao responder ativamente a estímulos fisiopatológicos, pode alterar seu padrão antitrombótico, e com a perda de sua integridade, liberar células endoteliais circulantes (CECs), que vêm sendo consideradas como possíveis marcadores para diversas doenças. Além disso, as células endoteliais formadoras de colônia (CEFCs) são um subtipo de células endoteliais progenitoras com notável potencial clonogênico e capacidade de vascularização *in vivo*, e devido a essas características de natureza endotelial, vem ganhando destaque a sua utilização como modelo *ex vivo* na investigação de doenças. Contudo, apesar do endotélio possuir um papel-chave na hemostasia, nenhum estudo avaliou as CEFCs na TVP aguda. Além disso, a impossibilidade de uma análise direta do endotélio, dificulta a compreensão do seu real papel na doença. Sendo assim, o objetivo principal deste trabalho foi caracterizar e avaliar a função celular das CEFCs de pacientes com TVP aguda em comparação à indivíduos saudáveis (CN). Os pacientes foram selecionados após a confirmação do diagnóstico de TVP de membros inferiores no período de julho de 2019 a setembro de 2021. A casuística foi constituída de 25 pacientes com TVP aguda (idade média 45 ± 13 anos), sendo que 20 retornaram para a segunda coleta (TVP >6 meses) e 38 CN (idade média 36 ± 10 anos). Segregamos as avaliações em 2 grupos: (1) avaliação descritiva e laboratorial de pacientes com TVP aguda, TVP >6 meses e CN e (2) avaliação da função endotelial e parâmetros biológicos, com caracterização das células por imunofenotipagem e porcentagem de células senescentes, proliferação, apoptose, migração celular e capacidade de geração de trombina (TGT), comparadas aos CNs. Também realizamos uma subanálise para a identificação de marcadores biológicos envolvidos no sucesso da obtenção de CEFCs previamente isoladas a partir do sangue periférico e expandidas em cultura. Como resultados, no grupo 1 demonstramos um aumento plasmático nas interleucinas (IL) pró-inflamatórias IL-6, IL-8, do fator de crescimento derivado plaquetário (PDGF-AA/AB) e da molécula de adesão P-selectina, e uma maior frequência de CECs nos pacientes com TVP aguda em relação aos CNs. Observamos que na TVP >6 meses a IL-6, IL-8, P-selectina e CECs estavam diminuídos em comparação à TVP aguda, porém observamos um aumento da Molécula de adesão intercelular solúvel 1 (sICAM-1) e Molécula de adesão vascular solúvel 1 (sVCAM-1). Quanto ao grupo 2, o sucesso na obtenção das CEFCs foi de 37% no grupo CN, 20% na TVP aguda e 25% na TVP >6 meses. Os testes de função celular das CEFCs em pacientes com TVP aguda vs. CN revelou células com menor capacidade proliferativa e de migração, e mais

células em apoptose. Já o TGT demonstrou células com propriedades similares entre os grupos. As análises do sobrenadante celular evidenciaram o aumento da expressão de IL-6 nas CEFCs de pacientes com TVP aguda. Ainda não temos a finalização desses testes na TVP >6 meses para comparação da TVP em dois momentos distintos. Por fim, alguns fatores parecem estar envolvidos no surgimento e manutenção do cultivo celular, como o aumento de sICAM-1 e sVCAM-1 tanto no plasma como no sobrenadante das células que foram isoladas. Como conclusão, definimos que é possível estabelecer o isolamento das CEFCs em pacientes com TVP aguda, no entanto com baixas taxas de sucesso, e isso pode ser atrelado aos achados deste trabalho em relação a alteração das propriedades funcionais, principalmente na capacidade replicativa e de reparo celular. No mais, acreditamos que as células também podem ser afetadas com o ambiente extracelular na fase aguda frente à estímulos pró-inflamatórios.

Palavras-chave: Disfunção endotelial; Trombose Venosa Profunda; Células Endoteliais.

ABSTRACT

Deep Vein Thrombosis (DVT) is defined as a pathological process resulting from changes in the vessel walls, blood flow, and/or blood composition, which leads to the formation of a thrombus within the vessel. Despite current knowledge, much remains to be understood about the risk factors associated with DVT. When the vascular endothelium actively responds to pathophysiological stimuli, the antithrombotic pattern of this endothelium can change; and with the loss of integrity, occurs a release of endothelial cells (CECs), which have been considered possible markers for several diseases. In addition, endothelial colony-forming cells (ECFCs) are a subtype of endothelial progenitor cells with remarkable clonogenic potential and *in vivo* vascularization capacity, and due to these characteristics of endothelial nature, are being used as an *ex vivo* model in disease investigation. However, despite the endothelium playing a key role in hemostasis, no study has evaluated the ECFCs in acute DVT. In addition, the impossibility of a direct analysis of the endothelium makes the actual role of the endothelium in the disease difficult to understand. Therefore, the main objective of this work was to characterize and evaluate the cellular function of the ECFCs of patients with acute DVT compared to healthy individuals (controls, CN). Patients were selected after confirmation of the diagnosis of DVT of the lower limbs from July 2019 to September 2021. The groups consisted of 25 patients with acute DVT (mean age 45 ± 13 years), with 20 follow-ups (DVT >6 months) and 38 HI (mean age 36 ± 10 years). We divided the assessments into 2 groups: (1) descriptive and laboratory assessment of patients with acute DVT, DVT >6 months, and HI; and (2) evaluation of endothelial function and biological parameters, with the characterization of cells by immunophenotyping and percentage of senescent cells, proliferation, apoptosis, cell migration, and thrombin generation capacity (TGT), compared to HI. In addition, we performed a sub analysis for the identification of biological markers involved in the success of obtaining ECFCs previously isolated from peripheral blood and expanded in culture. As a result, in group 1 we demonstrated a plasmatic increase of the pro-inflammatory interleukins (IL) IL-6, IL-8, platelet-derived growth factor (PDGF-AA/AB), and P-selectin adhesion molecule, and a higher frequency of ECs in patients with acute DVT compared to HI. Thus, we observed that in DVT >6 months IL-6, IL-8, P-selectin, and CECs were decreased compared to acute DVT, however, we observed an increase in Soluble Intercellular Adhesion Molecule 1 (sICAM-1) and Vascular Adhesion Molecule soluble 1 (sVCAM-1). In group 2, success in obtaining ECFCs was 37% in the HI group, 20% in the acute DVT, and 25% in the DVT >6 months. Cell function tests of ECFCs in patients with acute DVT vs. HI revealed cells with lower proliferative and migratory capacity, and more cells in apoptosis. TGT showed cells with similar properties between groups. Cell supernatant analyzes showed an increase in IL-6 expression in the ECFCs of patients with acute DVT. We have yet to complete these tests at DVT >6 months to compare

DVT at two different times. Finally, some factors appear to be involved in the emergence and maintenance of cell culture, such as the increase in sICAM-1 and sVCAM-1 both in plasma and in the supernatant of cells that were isolated. In conclusion, we defined that it is possible to establish the isolation of ECFCs in patients with acute DVT, however with low success rates, and this can be linked to the findings of this work regarding the change in functional properties, especially in the replicative and regenerative capacity. Furthermore, we believe that cells can also be affected by the extracellular environment in the acute phase in the face of pro-inflammatory stimuli.

Keywords: Endothelial dysfunction; Deep vein thrombosis; Endothelial Cells.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Células endoteliais e o fenótipo de coagulação, figura de autoria própria....	24
Figura 2. Fluxograma dos grupos de estudo avaliados neste trabalho.....	30
Figura 3. Fluxograma do delineamento experimental entre os 3 grupos estudados....	32
Figura 4. Estratégia de análise das CECs pelo software FlowJo.	35
Figura 5. Esquema representativo da obtenção das células mononucleares, figura de autoria própria.	37
Figura 6. Representação esquemática da cultura de CEFCs, figura de autoria própria.	38
Figura 7. Máscara de análise de confluência das CEFCs com 6 horas de experimento no software Incucyte®.....	41
Figura 8. Máscara de análise para apoptose no software Incucyte®.....	42
Figura 9. Máscara de análise para ensaio de migração das CEFCs no software Incucyte®.....	44
Figura 10. Esquema representativo dos parâmetros fornecidos pela curva de geração de trombina.	46
Figura 11. Fluxograma do grupo amostral entre os 3 grupos estudados.....	49
Figura 12. Mensuração de mediadores inflamatórios de pacientes com TVP aguda vs. CN.	54
Figura 13. Níveis de moléculas de adesão solúveis no plasma de pacientes com TVP aguda vs CN.....	55
Figura 14. Frequência celular das CECs e correlação com sVCAM-1.....	56
Figura 15. Mensuração de mediadores inflamatórios de pacientes com TVP aguda vs. TVP >6meses.	58
Figura 16. Níveis de moléculas de adesão solúveis no plasma de pacientes com TVP aguda vs TVP >6meses..	59
Figura 17. Frequência prospectiva de CECs nos grupos TVP aguda e TVP follow-up..	59
Figura 18. Estabelecimento e caracterização morfológica das CEFCs..	61
Figura 19. Ensaio de Proliferação no equipamento Incucyte®.	64
Figura 20. Avaliação do efeito plasmático sobre ensaio de proliferação em CEFCs CN.	65
Figura 21. Ensaio de migração no equipamento Incucyte®.	66
Figura 22. Ensaio de apoptose no equipamento Incucyte® após distintos tratamentos celulares.....	67

Figura 23. Senescência celular representada por células coradas com SA-β Gal. Figura A demonstra aumento de CEFCs senescentes no grupo TVP aguda comparado com CEFCs CN.....	68
Figura 24. Mensuração de mediadores solúveis no plasma de pacientes com TVP aguda e CN – grupo 3.	70
Figura 25. Mensuração de mediadores solúveis no plasma de pacientes com TVP aguda vs. CN – grupo 3.	71
Figura 26. Mensuração de mediadores solúveis no sobrenadante do ensaio de proliferação.....	72
Figura 27. Mensuração de mediadores solúveis no sobrenadante do ensaio de proliferação.....	73
Figura 28. Níveis de moléculas de adesão solúveis no plasma e sobrenadante cultura sem e com sucesso na obtenção de CEFCs.....	75
Figura 29. Frequência de CECs nos grupos com apenas MNCs e sucesso CEFCs.. ...	76
Figura 30. Fluxograma dos principais achados no grupo 1 e 2.	77
Figura 31. Fluxograma dos principais achados na subanálise: Apenas MNCs vs Sucesso CEFCs..	78

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Definições para TVP provocada por fatores de risco transitórios ou permanentes.....	21
Tabela 2. Reagentes utilizados na suplementação do meio EGM-2.....	36
Tabela 3. Painel de anticorpos para marcação celular	39
Tabela 4. Analitos dosados em amostras de plasma e sobrenadante celular nos grupos 1-3.....	47
Tabela 5. Lista dos critérios de exclusão dos pacientes com TVP aguda.....	50
Tabela 6. Descrição dos pacientes com TVP aguda provocada e fatores de risco associados.....	51
Tabela 7. Dados clínicos dos pacientes com TVP aguda e CN.....	52
Tabela 8. Parâmetros hematológicos dos grupos controle e TVP aguda.....	53
Tabela 9. Parâmetros hematológicos dos grupos TVP aguda e follow-up.....	57
Tabela 10. Dados dos indivíduos CN e TVP aguda que obtiveram sucesso no isolamento das CEFCS.....	62
Tabela 11. Caracterização das CEFCS por citometria de fluxo	63
Tabela 12. Teste de geração de trombina em CEFCS CN e TVP aguda.....	69

LISTA DE ABREVIATURAS

ADP	Adenosina 5' difosfato
ADVENTH	Acute deep vein thrombosis
AMP	Monofosfato de adenosina
AVC	Acidente vascular cerebral <i>Blood outgrowth endothelial cells</i> (endoteliais progenitoras circulantes)
BOECs	
BSA	Albumina de soro bovino
CD	Cluster de designação
CECs	Células endoteliais circulantes
CEFCs	Células endoteliais formadoras de colônia
CEPS	células endoteliais progenitoras
CEs	Células endoteliais
CN	Controle
DMSO	<i>Dimethyl sulfoxide</i> (dimetilsulfóxido)
DP	Desvio padrão
EBM	<i>Endothelial basal media</i> (meio endotelial basal)
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EGM-2	<i>Endothelial Growth Media</i> (meio de crescimento endotelial)
EPCs	Endothelial progenitor cel
ETP	Potencial de trombina endógena
FSC	<i>Forward scatter</i>
FT	Fator tecidual
HAS	Hipertensão arterial
hBGF	Fator de crescimento ligado a heparina
hEGF	Fator de crescimento epidermal
hFGF	Fator de crescimento de fibroblastos humanos
IAM	Infarto agudo do miocárdio
IFN-γ	Interferon gamma
IIQ	Intervalo interquartil
IL	Interleucina
IMC	Índice de massa corpórea
ISTH	<i>International Society of Thrombosis and Hemostasis</i> (Sociedade Internacional de Trombose e Hemostasia)
MACs	<i>Myeloid Angiogenic cells</i> (células angiogênicas mielóides)
MID	Membro inferior direito
MIE	Membro inferior esquerdo
MNCs	Células mononucleares
NETs	<i>Neutrophil extracellular traps</i> (Armadilhas extracelulares de neutrófilos)
NOS	Óxido nítrico sintase
NSA	Não se aplica
OECs	<i>Outgrowth endothelial cells</i> (Expansão de células endoteliais)
OMS	Organização Mundial da Saúde
PAF	Fator de ativação plaquetária
PAI-1	Inibidor do ativador do plasminogênio tipo I
PAR-1	Receptor-1 ativado por protease

PBMC	<i>Peripheral blood mononuclear cells</i> (Células mononucleares do sangue periférico)
PBS	<i>Phosphate-Buffered Saline</i> (Salina tamponada com fosfato)
PDGF	Fator de crescimento derivado de plaqueta
PGL2	Prostaciclina
R3IGF-1	Fator de crescimento de insulina <i>Research Electronic Data Capture</i> (Captura Eletrônica de Dados de Pesquisa)
REDcap	
ROS	Espécies reativas de oxigênio
RWD	<i>Relative wound density</i> (Densidade relativa da ferida)
sCD40L	CD40 ligante solúvel
SFB	Soro fetal bovino
sICAM-1	Molécula de adesão intercelular solúvel 1
SPT	Síndrome pós-trombótica
SSC	<i>Side scatter</i>
sVCAM-1	Molécula de adesão vascular solúvel 1
sVEFR-2	Fator de crescimento endotelial vascular, receptor 2 solúvel
TA	Temperatura ambiente
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
TEP	Tromboembolismo pulmonar
TEV	Tromboembolismo venoso
TGT	Teste de geração de trombina
TNF-α	<i>Tumor necrosis factor alpha</i> (fator de necrose tumoral alfa)
t-PA	Ativador de plasminogênio tipo tecido
TVP	Trombose venosa profunda
TXA4	Tromboxano A2
u-PA	Ativador de plasminogênio tipo uroquinase
US	Ultrassom
VEGF	Fator de crescimento vascular endotelial
vWF	Fator de von Willebrand

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	19
1.1. Trombose Venosa Profunda.....	19
1.2. Endotélio Vascular.....	23
1.3. Trombose, CECs e CEFCs.....	26
2. OBJETIVOS	28
2.1. Objetivo Geral.....	28
2.2. Objetivos específicos.....	28
3. METODOLOGIA	29
3.1 Aspectos éticos do estudo.....	29
3.2 Casuística.....	29
3.3 Delineamento experimental.....	31
3.4 Coleta de dados.....	32
3.5 Coleta de sangue e processamento das amostras.....	33
3.6 Citometria de Fluxo CECs – Sangue total.....	33
3.7 Isolamento das células mononucleares do sangue periférico.....	35
3.8 Imunofenotipagem CEFCs - Citometria de Fluxo.....	39
3.9 Descongelamento das CEFCs.....	39
3.10 Ensaio no equipamento Incucyte Zoom™.....	40
3.11 Análise de senescência.....	44
3.12 Teste de geração de trombina (TGT).....	45
4. RESULTADOS	49
5. DISCUSSÃO	79
6. CONCLUSÃO	89
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	90
8. ANEXOS	98

1. INTRODUÇÃO

1.1. Trombose Venosa Profunda

A trombose venosa profunda (TVP) é caracterizada pela formação de um trombo (coágulo) dentro de veias profundas, sendo mais frequente em membros inferiores (1). Em sua fase aguda, a principal complicação é o possível desprendimento do trombo ou parte dele, que pode migrar para os vasos pulmonares e causar tromboembolismo pulmonar (TEP) – um preditor independente de sobrevida reduzida (2,3). Em conjunto, TVP e TEP compreendem o tromboembolismo venoso (TEV), caracterizado como um dos mais importantes problemas de saúde pública.

Estudos epidemiológicos apontam o TEV como a terceira principal causa de morte associada a doenças cardiovasculares, após infarto do miocárdio e acidente vascular cerebral (4), com uma incidência anual estimada de 0,5 a 2 casos para cada 1000 indivíduos na população geral (5,6), sendo predominante em grupos de idade mais avançada (4 a 8 casos acima de 60 anos).

Apesar do elevado número de casos e suas complicações, o TEV não está listado como parte do estudo “*Global burden of diseases, injuries and risk factors study*” iniciado pela Organização Mundial da Saúde (OMS) (4,7), e informações sobre a incidência de TEV podem ser escassas em alguns países, como por exemplo no Brasil.

No Brasil, a epidemiologia do TEV é pouco conhecida, e poucos são os estudos publicados, apesar de indicarem que o TEV pode representar a quinta causa de hospitalização pelo Sistema Único de Saúde (7, 8), e a alta incidência de justificativas de afastamento de contribuintes do Instituto Nacional de Segurança Social.

Estudos mostram que a profilaxia em alguns casos, como pós-cirúrgico, tornam o TEV a causa número um de morte hospitalar prevenível (9). No entanto, a diferença de acesso e qualidade da saúde em hospitais (10), no diagnóstico e no ajuste adequado da tromboprofilaxia tornam-se um grande desafio no manejo desses pacientes (11).

Além disso, como complicações da TVP em longo prazo, podemos citar que aproximadamente 50 % dos pacientes desenvolvem a síndrome pós-trombótica (SPT) (12) caracterizada por um conjunto de sinais e sintomas tais como dor, edema e

ulceração de pele – sendo utilizado a escala de Villalta como ferramenta diagnóstica de SPT. Bem como, cerca de 30% pacientes com TVP podem apresentar recorrência do evento trombótico dentro de 10 anos (2), impactando na qualidade de vida desses indivíduos.

A TVP é uma doença de natureza multicausal em que a interação de fatores de risco genéticos e adquiridos pode desencadear o processo trombótico, sendo que em aproximadamente 30% dos pacientes não se identifica nenhum fator de risco evidente, fato que sugere a necessidade da avaliação da presença de mecanismos adicionais ainda desconhecidos na etiologia da doença (13–15).

Fisiopatologia da TVP

Os termos "trombose" e "embolia" foram definidos pelo médico alemão Rudolf Virchow em 1856, que foi o primeiro a demonstrar uma ligação mecanicista entre TVP e embolia pulmonar. Embora estudos recentes descrevam outros mecanismos biológicos relacionados a trombose, a Tríade de Virchow permanece como uma descrição clássica dos três fatores trombogênicos: (1) hipercoagulabilidade, (2) mudanças no fluxo sanguíneo e (3) disfunção endotelial (16,17).

Em geral, a (1) hipercoagulabilidade está relacionada a uma ativação excessiva ou anormal da coagulação dentro dos vasos, levando à geração de trombina intravascular, deposição de fibrina e formação de trombos, o que prejudica o fluxo sanguíneo (1). Estes distúrbios na coagulação podem ser ocasionados por defeitos genéticos como a mutação G20210A no gene da protrombina, a mutação que caracteriza o fator V Leiden, a deficiência nos anticoagulantes naturais; bem como adquiridos, como a presença de anticorpos antifosfolídeos (18).

As alterações hemodinâmicas (2), como estase e turbulência do fluxo sanguíneo, aparentam ser um fator patogênico importante para a trombose. Por exemplo, um estudo de pacientes com paralisia em uma das pernas mostrou maior incidência de TVP nesse membro em relação à perna móvel (53% contra 7%, respectivamente) (19). Além disso, essas alterações impactam diretamente no endotélio (3), componente de interesse de avaliação deste projeto, abordado no tópico 1.2.

A presença dos fatores de risco vão de alguma forma alterar um ou vários dos componentes da Tríade de Virchow, e a maior parte deles são adquiridos, e são classificados segundo a *International Society of Thrombosis and Hemostasis* (ISTH), como permanentes ou transitórios maior ou menor, descritos na tabela 1 (20).

Tabela 1. Definições para TVP provocada por fatores de risco transitórios ou permanentes

Fatores de risco permanentes
Câncer ativo
Doença inflamatória intestinal
Fator de risco transitório maior
*ocorreu durante os 3 meses antes do diagnóstico da TVP
Cirurgia com anestesia acima de 30 minutos
Cesária
Recorrência após o término do anticoagulante
Imobilização no hospital com doença aguda (>3 dias)
Fator de risco transitório menor
*ocorreu durante os 2 meses antes do diagnóstico da TVP
Cirurgia com anestesia abaixo de 30 minutos
Trauma ou fraturas
Gravidez e puerpério
Imobilização fora do hospital - mobilidade reduzida (> 3 dias)
Contraceptivos orais e terapia de reposição hormonal

Dados retirados do guia *Categorization of patients as having provoked or unprovoked venous thromboembolism: guidance from the SSC of ISTH*, 2016.

Sendo assim, frente a ausência ou presença dos fatores de risco, a TVP pode ser classificada como não provocada (espontânea) ou provocada (adquirida).

Biomarcadores na TVP

Devido a heterogeneidade dos fatores de riscos envolvidos na TVP, e dificuldade no tratamento com anticoagulantes (dosagem da droga vs sangramento), alguns estudos propõem a identificação de alguns biomarcadores como ferramentas de diagnóstico eficazes e possíveis alvos terapêuticos (21,22).

O teste dímero D é o biomarcador mais bem estabelecido de um processo fibrinolítico em andamento, e apresenta um valor preditivo altamente negativo, permitindo a exclusão de um processo contínuo de formação de coágulos, o que significa que pode ser usado para excluir TVP em um paciente com baixa probabilidade pré-teste (23,24). No entanto, o ensaio dímero D tem uma alta sensibilidade, mas uma baixa especificidade, visto que este marcador pode estar aumentado em situações como infecção, gravidez, pós-operatório, entre outros (25,26).

Recentemente, a P-selectina vem sendo associada como uma proposta de biomarcador com um desempenho favorável (27,28), principalmente quando associada ao teste de dímero D (27,29). Esta molécula de adesão é um importante mediador de adesão e transmigração de leucócitos e células imunes para locais de inflamação, que facilita e aumenta a trombose modulando a atividade de neutrófilos e monócitos. Em humanos, níveis elevados de P-selectina solúvel são comuns na TVP (30–32) e a inibição dessa selectina parece ser uma via promissora de estudo futuro como um tratamento autônomo para TEV ou como adjuvante às terapias anticoagulação padrão (28).

Marcadores inflamatórios também são descritos na literatura, como por exemplo os níveis elevados da proteína C reativa (PCR) em pacientes com TVP (33,34). No entanto, estudos demonstram não haver correlação entre os níveis basais de PCR e o desenvolvimento subsequente de TEV, uma vez que este não é um marcador de inflamação específico na trombose (35,36). E os níveis elevados das interleucinas (IL) inflamatórias IL-6, IL-8, e Fator de necrose tumoral- α (TNF- α) podem influenciar a expressão de fator tecidual, um iniciador da via extrínseca da coagulação, proporcionando assim um gatilho que pode levar à doença trombótica (37–39).

No geral, estudos têm demonstrado o uso de alguns biomarcadores, como D-dímero, selectinas, micropartículas ou citocinas inflamatórias, para o diagnóstico e tratamento da trombose venosa, porém cada um deles apresenta um papel diferente nos propósitos diagnósticos ou prognósticos da TVP e não há um único biomarcador disponível para confirmar exclusivamente o diagnóstico de trombose venosa.

1.2. Endotélio Vascular

O endotélio é constituído de uma monocamada celular que reveste internamente os vasos sanguíneos, formando uma barreira semipermeável, a qual permite a livre passagem de moléculas e de células entre o sangue e o tecido (40). Devido a esta localização estratégica, o endotélio apresenta uma função crucial no controle de várias respostas como manutenção do tônus vascular, regulação fisiológica da circulação leucocitária, na angiogênese, e uma participação importante na homeostasia e hemostasia (41,42).

Na hemostasia, as células endoteliais (CEs) parecem apresentar fenótipo ambíguo secretando componentes ligados à ativação ou inibição da coagulação. Em condições normais, as CEs sintetizam e expressam componentes com propriedades anticoagulantes, antitrombóticas e pró-fibrinolíticas. No entanto, sob estímulos que levam à ativação endotelial, este pode se alterar para um fenótipo pró-trombótico / pró-coagulante, figura 1 (43–45).

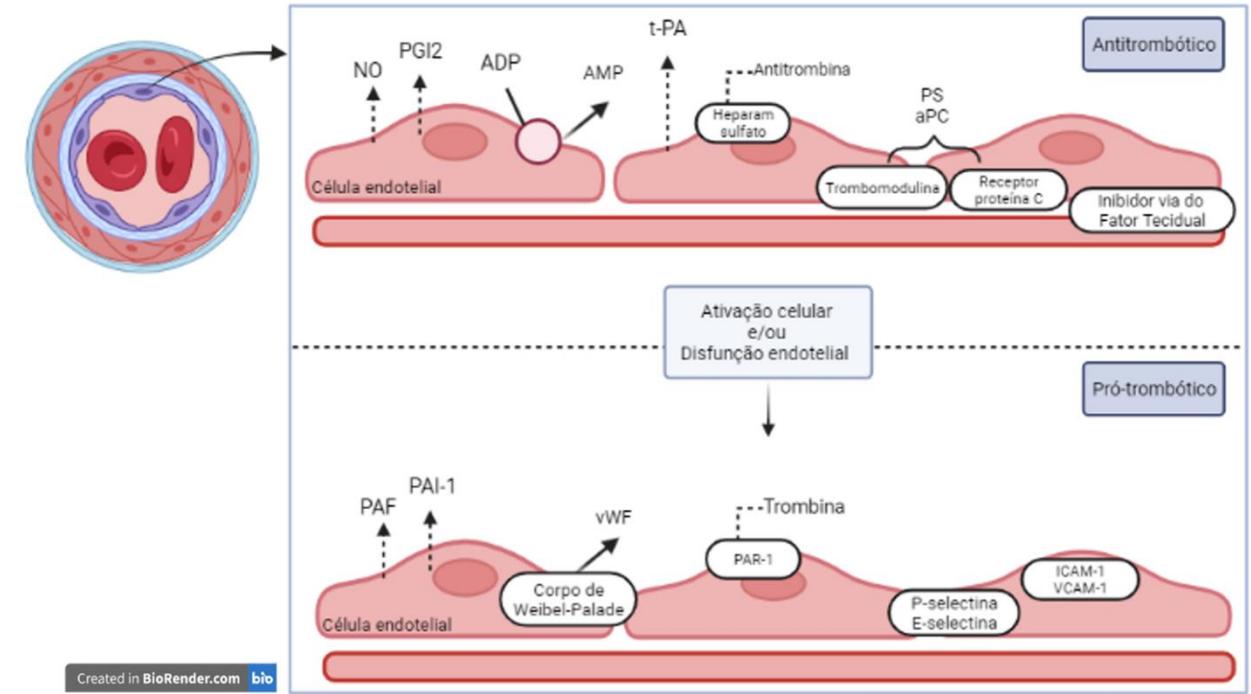


Figura 1. Células endoteliais e o fenótipo de coagulação, figura de autoria própria. Em condições normais, as células endoteliais apresentam um perfil antitrombótico: degradação do agente agregador ADP com ectonucleotidases; prevenção da hemostasia primária através da liberação PGI₂ e NO. Fenótipo anticoagulante: expressão do EPCR, PC, PS e TM. Fenótipo pró-fibrinolítico: liberação t-PA e possivelmente ativador do u-PA. Já na segunda condição, após disfunção celular, há a secreção de um perfil pró-trombótico: liberação do vWF, TXA₂ e PAF. Expressão PAR-1 que aumenta a liberação de vWF e reforça a ativação de células endoteliais, inibindo o PAI-1 e promove secreção de moléculas de adesão à superfície celular (ICAM-1, VCAM-1, E-selectina, P-selectina). **Abreviações:** adenosina 5' difosfato (ADP); monofosfato de adenosina (AMP); óxido nítrico sintase (NOS); prostaciclina (PGL₂); ativador de plasminogênio tipo tecido (t-PA); ativador de plasminogênio tipo uroquinase (u-PA); fator de ativação plaquetária (PAF); fator de von Willebrand (vFW); inibidor do ativador do plasminogênio tipo I (PAI); tromboxano A₂ (TXA₂); receptor-1 ativado por protease (PAR-1).

Essa ativação celular poderá ocorrer de acordo com determinado estímulo, por exemplo, estancar um sangramento e reparar o tecido vascular lesado. No entanto, a disfunção endotelial, um termo que abrange vários defeitos potenciais das células endoteliais, pode inclinar a balança para vários estados patológicos, dentre eles a trombose venosa (26).

Células endoteliais

O endotélio vascular é um órgão que atua em resposta a estímulos fisiopatológicos, tais como aterosclerose, hipertensão pulmonar, infarto agudo do

miocárdio, diabetes, falência renal, anemia falciforme, entre outros; e, dependendo da situação pode apresentar uma disfunção e perda de sua integridade de barreira, liberando células endoteliais circulantes (CECs) (46–50). Ainda, a presença dessas CEs maduras no sangue periférico pode ser considerada como um potencial marcador de dano tecidual, sendo descritas em patologias distintas, principalmente as que envolvem doenças vasculares (51,52).

Apesar dos dados relevantes relacionados às CECs, estudos debatem sobre essas células constituírem uma população altamente heterogênea, com baixa capacidade proliferativa e sobre uma possível origem mieloide ao invés de endotelial, pois possui alta expressão dos marcadores imunes CD14 e CD45.

Além das CECs, é descrito que o recrutamento de células endoteliais progenitoras (CEPs) da medula óssea e sua diferenciação em células endoteliais maduras seria um mecanismo adicional na recuperação da integridade endotelial no adulto (53). E, estas células em particular, geram grande interesse na comunidade científica em estudos funcionais visto que quando diferenciadas, aparentam apresentar uma célula verdadeiramente endotelial, sem indícios de derivação mieloide e com alta capacidade proliferativa - denominada de células endoteliais progenitoras tardias (EPCs tardias) ou células endoteliais formadoras de colônia (CEFCs), a qual falaremos a seguir (52,54).

Consenso sobre as EPCs e CEFCs

Nas duas últimas décadas, vários estudos buscaram identificar e caracterizar as CEPs, gerando diferentes nomenclaturas, protocolos de isolamento e descobertas de diversas populações celulares com expressão de diferentes marcadores fenotípicos (55,56).

O uso equivocado das EPCs de maneira generalizada gerou um grande debate quanto à acurácia dos dados que representam células endoteliais ou de linhagem hematopoiética. Essa confusão deve-se à origem das EPCs, oriundas dos hemangioblastos (57,58) e que compartilha precursores de células vasculares e hematopoiéticas, e portanto, podem apresentar dois tipos diferentes de população quanto à sua natureza: (1) mielóide - sem potencial proliferativo, incapaz de

vasculogenese pos-natal mas que apresenta alguns marcadores endoteliais (CD146, CD144, CD31, VEGFR2) e capacidade de sinalização parácrina, denominadas de EPCs jovem ou células mieloides angiogênicas (MAC); e (2) endotelial – função importante de formação de novos vasos *in vitro*, não apresenta expressão de marcadores hematopoiéticos (CD45) e monocíticos (CD14), altamente proliferativa, classificadas como CEFCs (59,60).

Recentemente, foi proposta uma revisão de terminologia no sentido de caracterização deste tipo celular sendo eleito o uso padrão de células endoteliais formadoras de colônia (CEFCs) ou em inglês Endothelial Colony-Forming Cells (ECFCs) (59) no lugar das *BOECs* (*Blood outgrowth endothelial cells*), *OECs* (*Outgrowth endothelial cells*), e CEPs jovens. No mais, o conceito das CEFCs tem sido muito discutido visto que estas células ainda se encontram em fase de caracterização e entendimento frente a variações fenotípicas, moleculares e funcionais das células endoteliais.

As CEFCs são células com características de células maduras e morfologia característica de células endoteliais (*cobblestone*), podendo ser isoladas de cordão umbilical e sangue periférico por meio da cultura *in vitro* (59). Estas têm sido muito utilizadas em dois grandes campos: regeneração tecidual – potencial terapia regenerativa em lesões isquêmicas e em sistemas orgânicos (oclusão arterial periférica, isquemia cerebral, e lesão renal aguda) (61,62) – e como modelo *ex vivo* na investigação de doenças, em particular as vasculares (63).

Contudo, apesar dos grandes avanços no entendimento do funcionamento das CEFCs e sua padronização de conceitos, seu isolamento é considerado relativamente difícil dependendo da condição estudada. Isto porque as CEFCs são extremamente raras no sangue periférico, representando entre 0,01% e 0,1% das células mononucleares (64,65).

1.3. Trombose, CECs e CEFCs

Apesar do envolvimento endotelial no processo da TEV, na prática clínica as avaliações funcionais ou dos componentes endoteliais é muito limitada, pela falta de acesso direto a essas células.

Um trabalho de doutorado realizado por nosso grupo em 2010, com objetivo de padronizar a identificação e quantificação por citometria de fluxo das CECs em pacientes com TVP ao diagnóstico (aguda, 1ª coleta), e após no mínimo 6 meses do evento agudo, demonstrou um aumento significativo na frequência de CECs em relação aos controles (66). Ainda, com a padronização de um modelo animal de TVP induzida por lesão endotelial, os resultados demonstraram que as CECs somente foram liberadas quando o fluxo começou a ser restabelecido, e possivelmente podem constituir um marcador de dano vascular (66).

Visto que a utilização das CECs tem sido uma opção mais fidedigna da avaliação de disfunção endotelial, se faz interessante a avaliação dessas células na TVP. Na literatura, poucos estudos avaliaram as CECs em pacientes com TVP na fase tardia, com mais de 3 episódios de recorrência. Alvarado-Moreno et al., (2015) demonstrou uma anormalidade funcional e biológica dessas células (67,68), com redução do potencial proliferativo, alterações na membrana mitocondrial, alta taxa de senescência, aumento de espécies reativas de oxigênio (ROS), e expressão prejudicada dos genes efrina-B2 / Eph-4, que permitiram concluir que pacientes com histórico de TVP apresentavam CEFCS disfuncionais e poderiam ser associados ao risco permanente de novos eventos trombóticos. No entanto, uma limitação do estudo, é que os pacientes apresentavam comorbidades que poderiam impactar na real avaliação das CECs no contexto estudado, e a análise das CECs na fase tardia não nos permite o entendimento do endotélio logo após o processo de formação de trombo.

Assim, apesar dos avanços nos métodos de investigação das células endoteliais, tanto no seu papel proliferativo e reparador, como na interface com a hemostasia, poucos estudos investigaram os pacientes com TVP e nenhum estudo foi conduzido na fase aguda. Isto poderia contribuir para melhor conhecimento na fisiopatologia da doença, especialmente sobre a atividade endotelial nessa fase da doença.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

O objetivo deste trabalho foi caracterizar e avaliar a função celular das CEFCs em pacientes com TVP aguda, comparados a indivíduos saudáveis.

2.2. Objetivos específicos

- ❖ Padronizar a identificação das CECs no sangue periférico de pacientes com TVP aguda pelo método de citometria de fluxo;
- ❖ Estabelecer o cultivo das CEFCs em pacientes com TVP na fase aguda e indivíduos saudáveis;
- ❖ Caracterizar e comparar as CEFCs de pacientes com TVP aguda com indivíduos saudáveis (CN) quanto aos seguintes itens:
 - ❖ Função celular - Identificar a atividade proliferativa, de apoptose e regeneração celular através de ensaios utilizando sistema óptico de análise em tempo real;
 - ❖ Avaliar o efeito plasmático de CN e TVP nas CEFCs através do ensaio de proliferação celular;
 - ❖ Interface com Hemostasia – Identificar o papel das CEFCs no teste de geração de trombina;
- ❖ Verificar possíveis marcadores circulantes envolvidos na obtenção das CEFCs.

3. METODOLOGIA

3.1 Aspectos éticos do estudo

Os participantes foram incluídos no estudo mediante assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) previamente aprovado pelo comitê de ética em pesquisa da Unicamp, CAAEs:95633818.1.0000.5404 e 28642619.3.0000.5404. O estudo foi realizado em conformidade com a Declaração de Helsinque e com as normas para pesquisa em seres humanos do Brasil. O modelo do TCLE assinado em ambos os grupos foi anexado no final da tese como Anexo 1.

3.2 Casuística

Para este estudo, foram incluídos indivíduos de ambos os sexos com idades entre 18 e 70 anos, separados nos seguintes grupos experimentais:

- ❖ Indivíduos saudáveis – controle (CN);
- ❖ Pacientes com TVP na fase aguda;
- ❖ Pacientes com TVP pós 6 a 12 meses da fase aguda (avaliação prospectiva).

O critério de inclusão para TVP na fase aguda foi a confirmação de TVP de membros inferiores, proximal e/ou distal, por ultrassom *doppler*, em até 30 dias. Os critérios de exclusão foram: gestação ou lactação, câncer nos últimos 5 anos, diabetes *melittus*, doença renal, hepática ou inflamatória (fase aguda), tabagismo e etilismo. O grupo TVP >6 meses foi constituído pelos mesmos pacientes da fase aguda, que foram convidados a realizar uma nova coleta de sangue de 6 à 12 meses pós diagnóstico da TVP. Portanto os critérios de inclusão se mantiveram, e os de exclusão além daqueles relatados inicialmente que pudessem ocorrer nesse período de evolução, foram o tempo de seguimento superior a 12 meses do diagnóstico de TVP.

Os pacientes foram considerados como TVP não provocada, quando a trombose ocorreu na ausência de qualquer fator de risco desencadeante. Já os pacientes foram incluídos como TVP provocada quando esta foi desencadeada por 1 ou mais fatores de risco transitórios (maior ou menor), descritos na tabela 1 da introdução.

Para os CN, estes não podiam apresentar histórico de TVP e seguiram os mesmos critérios de exclusão mencionados para o grupo TVP.

Como um dos objetivos do estudo foi avaliar a função de células endoteliais primárias, segregamos em grupos aqueles em que as CEFCs foram isoladas, conforme demonstrado no fluxograma abaixo:



Figura 2. Fluxograma dos grupos de estudo avaliados neste trabalho. Os grupos foram separados entre sucesso e não sucesso na obtenção das CEFCs, sendo avaliado no grupo 1 os achados descritivos e laboratoriais da coorte geral e no grupo 2 a função celular só daqueles em que obtivemos as CEFCs. Como uma subanálise, verificamos os possíveis marcadores plasmáticos e a frequência das CECs envolvidos no sucesso da obtenção das CEFCs. **Abreviações:** Células formadoras de colônia circulantes (CEFCs); Controle (CN); Trombose venosa profunda (TVP); Células mononucleares (MNCs).

Captação dos indivíduos

Os pacientes foram selecionados do projeto ADVENTH-Campinas (*Acute Deep Vein Thrombosis*), um registro de pacientes com TVP ao diagnóstico, atendidos em alguns centros da região metropolitana de Campinas: Hospital das Clínicas da Unicamp, Hospital Dr Celso Pierro da PUCCampinas, Hospital Beneficência Portuguesa, Hospital Santa Ignês, Hospital Centro Médico de Campinas, Hospital Irmãos Penteados, e clínicas privadas de Cirurgiões Vasculares.

A notificação de pacientes diagnosticados com TVP, por ultrassom (US) *doppler* ou outro método de imagem, foi realizada através do contato de médicos

radiologistas e/ou vasculares participantes deste estudo, com os pesquisadores da Unicamp. No caso do HC/UNICAMP, foi realizada uma busca ativa através da verificação semanal de exames de US *doppler* no sistema AGHuse.

Para o grupo de avaliação prospectiva, os pacientes da fase aguda foram contactados no período de 6 a 12 meses da data de diagnóstico do evento fonte para realização de uma nova entrevista e coleta de sangue no Laboratório de Hemostasia / Hemocentro.

No caso dos voluntários, considerados como indivíduos saudáveis, foram recrutados alunos e funcionários do Hemocentro da UNICAMP.

3.3 Delineamento experimental

Este estudo avaliou grupos distintos, bem como material e tipo de análise. Esta segregação ocorreu conforme o sucesso no isolamento ou não das CEFCs, e para melhor entendimento das análises inserimos um fluxograma (figura 3) com as atividades executadas neste projeto.

Para entendimento dos grupos, o grupo inicial (grupo 1) foi avaliado de forma descritiva, e todos os pacientes selecionados de acordo com os critérios de inclusão e exclusão. Estes foram comparados, com os CNs e também prospectivamente após os 6 meses do diagnóstico. Neste grupo buscamos descrever os dados clínicos, hematológicos, plasmáticos e de frequência celular.

O grupo 2 avaliou os dados clínicos e plasmáticos, bem como de função endotelial apenas daqueles em que houve obtenção das CEFCs no CN, TVP aguda e TVP >6 meses, sendo considerada a coorte de interesse deste estudo.

No mais, para investigação de possíveis mecanismos envolvidos no sucesso na obtenção das CEFCs tanto no grupo CN como TVP aguda, realizamos uma subanálise quanto aos marcadores presentes no plasma/sobrenadante, e de frequência celular do grupo contendo apenas mononucleares [MNCs] e naqueles que obtivemos sucesso com as CEFCs.

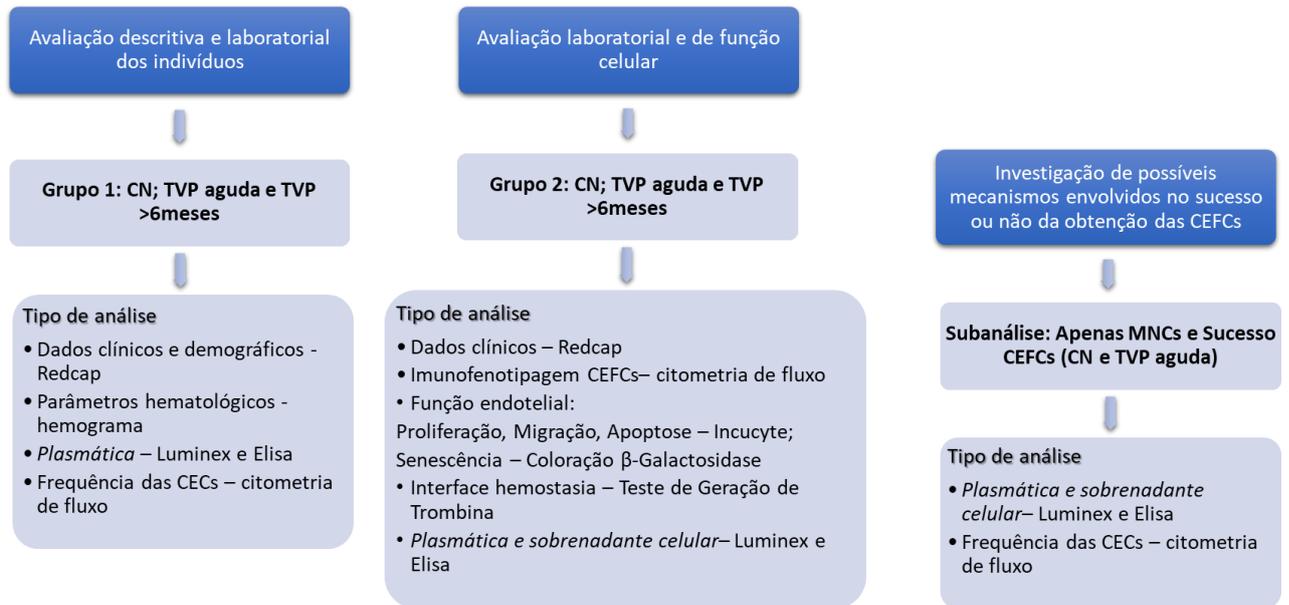


Figura 3. Fluxograma do delineamento experimental entre os 3 grupos estudados. No esquema acima foram descritas o tipo de metodologia e material (plasma ou sobrenadante celular) a serem avaliados neste trabalho. **Abreviações:** Células formadoras de colônia circulantes (CEFCs); Controle (CN); Trombose venosa profunda (TVP); Mononucleares (MNCs); Célula endotelial circulante (CEC).

3.4 Coleta de dados

No mesmo dia da coleta de sangue, os pacientes foram entrevistados a fim de obtermos dados clínicos. A ficha de entrevista segue ao final desta tese, como Anexo 2.

Caso alguma informação estivesse incompleta, prontuários físicos e eletrônicos foram acessados. Os dados da entrevista foram inseridos no REDCap (*Research Electronic Data Capture*), que é um *software* EDC baseado em navegador e orientado por metadados e metodologia de fluxo de trabalho, para projetar bancos de dados de pesquisa clínica.

Além disso, investigamos a SPT e taxa de recorrência no retorno dos pacientes. A SPT é uma complicação crônica sintomática comum que pode ocorrer mesmo após o tratamento, sendo que 5 a 10% podem apresentar manifestações graves, como por exemplo, o surgimento de úlceras venosas. O critério mais utilizado para classificar a SPT, inclusive indicado pelo ISTH, é a escala de Villalta, a qual leva em consideração os sintomas relatados pelo paciente (dor, cãibra, sensação de peso, prurido e

parestesia), e sinais físicos avaliados pelo avaliador (edema, endurecimento da pele, dor durante a compressão da panturrilha, hiperpigmentação, vermelhidão e ectasia venosa). De 5 a 9 pontos a SPT é considerada leve, de 10 a 14 moderada, e ≥ 15 como grave (69,70).

3.5 Coleta de sangue e processamento das amostras

Para todos os participantes do projeto foram coletadas amostras de sangue periférico (100 mL), sendo 9 tubos contendo o anticoagulante heparina sódica para isolamento das CECs (protocolo descrito no item 3.6), 2 tubos de citrato de sódio 3,2 % para análises do plasma, 1 tubo seco para análises do soro, e 1 tubo de EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético) 10% para hemograma e citometria de fluxo.

As amostras foram processadas e armazenadas no Laboratório de Hemostasia do Hemocentro de Campinas/Unicamp, seguindo as normas determinadas no procedimento operacional referente ao biorrepositório deste estudo. No geral, os tubos de citrato e seco foram centrifugados a 3500 g por 15 minutos, e armazenados à - 80 °C, e para o plasma, as amostras foram re-centrifugadas, a fim de se obter um plasma pobre em plaquetas. Todo o processamento não excedeu o tempo máximo de 3 horas da coleta do sangue.

O hemograma foi realizado no contador hematológico *Cell Dyn Emerald* (Abbott - IL, EUA) do Laboratório de Controle de Qualidade/Hemocentro e após isso, o tubo de EDTA foi utilizado no protocolo de marcação celular para citometria de fluxo em sangue periférico, descrito a seguir.

3.6 Citometria de Fluxo CECs – Sangue total

Cem microlitros de sangue total por tubo foram incubados, por 20 minutos à 4 °C protegidos da luz, com 5,0 μ L de cada anticorpo monoclonal conjugados com os fluorocromos da empresa Biolegend (CA, EUA) de acordo com o painel: *tubo 1* - controle negativo e *tubo 2* - CD45 PerCp, CD133 APC, CD31 FITC e CD146 PE.

Após a incubação, os eritrócitos foram lisados com 2 mL de *FACS lysing* diluída 1:10 (Becton Dickinson [BD] - CA, EUA), e incubados novamente por 10 minutos, à 4

°C, protegido da luz. As células foram centrifugadas a 450 g por 5 minutos e lavadas com 2 mL PBS/BSA 2% (pH=7,4). Uma nova centrifugação foi realizada, o sobrenadante descartado e as células ressuspendidas com 300 µL de paraformaldeído 1% em PBS. A leitura foi realizada no dia seguinte com a aquisição de 300.000 eventos no citômetro de fluxo FACSCalibur (BD - CA, EUA) através do *software* Cell-Quest. A análise dos dados foi realizada pelo *software* BD FlowJo™, versão 10 (BD - CA, EUA).

Estratégia de análise

No gráfico ou *dot plot*, FSC (tamanho) x SSC (granulosidade) foram selecionados todos os eventos, exceto os *debris* localizados à esquerda (figura 4).

Uma vez determinada a frequência total de eventos, o cálculo das CECs foi realizado pela fórmula:

$$CEC = \frac{\% \text{ eventos} \times n^{\circ} \text{ leucócitos}/(\mu\text{L})}{100} = n^{\circ} \text{ CEC}/\mu\text{L}$$

100

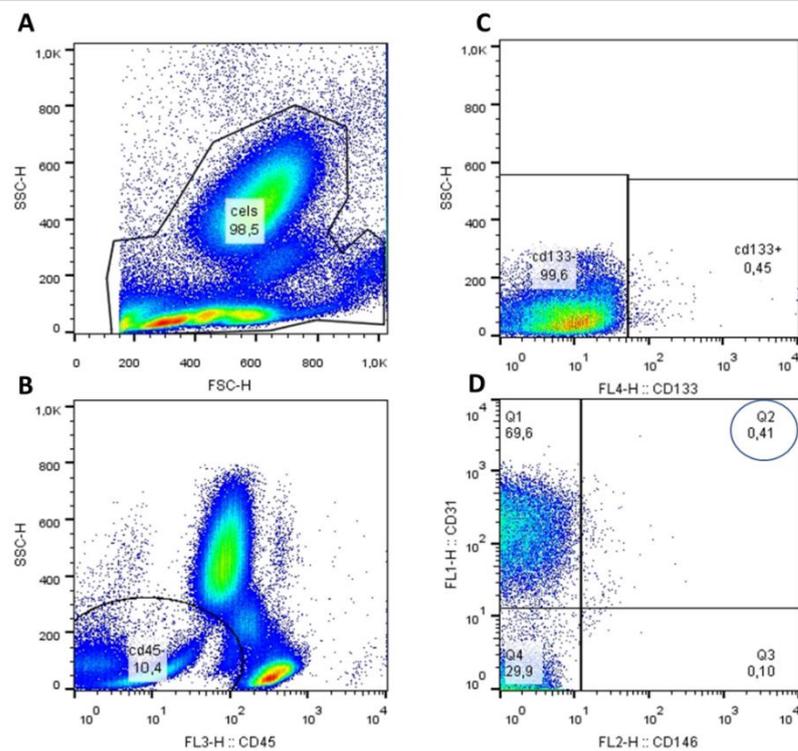


Figura 4. Estratégia de análise das CECs pelo software FlowJo. No gráfico CD45 (leucócitos) x SSC foram selecionadas as células CD45 negativas até um positivo fraco (CD45dim) para a exclusão de leucócitos (figura 1b). No *dot plot* SSC x CD133 foi selecionada a população CD133⁻ (figura 1c), e então foram consideradas CECs as células duplo-positivas para CD31 e CD146 (figura 1d). **Abreviações:** Side Scatter (SSC); Forward Scatter (FSC); Cluster de designação (CD).

3.7 Isolamento das células mononucleares do sangue periférico

3.7.1. Preparo da placa com colágeno

As CECs devem ser cultivadas em placas revestidas com matriz extracelular, e optamos por utilizar o colágeno tipo 1 de cauda de rato (código [cód] C3867, Sigma – MO, EUA). Para as placas de 12 poços (cód. 3737, Corning – NY, EUA) foram utilizados 0,5 ml/poço de colágeno previamente diluído com água para injeção, e incubadas por pelo menos 2 horas a 37 °C, depois lavada 1 vez com solução salina tamponada fosfatada (*Phosphate-Buffered Saline*, PBS), e secadas na incubadora de CO₂ overnight.

3.7.2. Preparo do meio *Endothelial Growth Media* (EGM-2)

O meio EBM-2 foi suplementado com os fatores do kit EGMTM-2 (Lonza - MD, EUA) composto de: fator de crescimento de fibroblastos humanos (hFGF), fator de crescimento vascular endotelial (VEGF), hidrocortisona, fator de crescimento de insulina (R3IGF-1), fator de crescimento ligado a heparina (hBGF), fator de crescimento epidermal (hEGF), ácido ascórbico, heparina, gentamicina e anfotericina. Além disso, foram adicionados outros reagentes descritos na tabela 2.

Tabela 2. Reagentes utilizados na suplementação do meio EGM-2

Volume	Reagente	Código, Marca
450 mL	meio EBM-2	CC-3156, Lonza
	EGM TM -2 Single Quots	CC-4176, Lonza
10% (50 mL)	SFB	12657-029, Gibco
5 mL	penicilina / estreptomicina (100U/mL)	15140122, Thermofisher
0,5 mL	anfotericina B	15290026, Thermofisher
50 µL	l-glutamina	35050061, Thermofisher

Abreviações: Meio basal endotelial (EBM); Meio de crescimento de células endotelial (EGM) e soro fetal bovino (SFB).

3.7.3. Isolamento e cultura das CEFCs

O protocolo descrito a seguir, foi desenvolvido de acordo com o estágio realizado no Laboratório do Professor Reinhold Medina na Universidade Queen's de Belfast (Irlanda do Norte, Reino Unido), e com modificações de Sakamoto et al., (71).

Todos os experimentos foram realizados no fluxo laminar, com reagentes e materiais estéreis. Primeiramente, os tubos de sangue com heparina foram diluídos na proporção 1:1 com PBS (pH 7,4) em tubos cônicos, e, posteriormente, submetidos a centrifugação em gradiente de densidade com o reagente Ficoll-PaqueTM Plus 1.077 (cód. 17544203, GE Healthcare – Uppsala, Suécia) por 30 minutos a 317 g em temperatura ambiente (TA), sem freio. A figura 5 a seguir representa o processo de obtenção das MNCs.

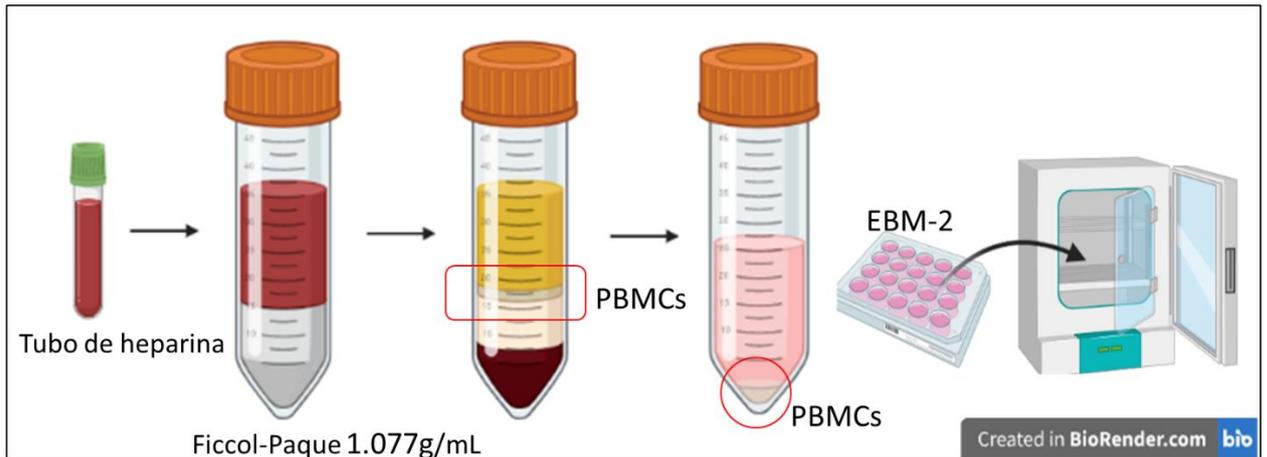


Figura 5. Esquema representativo da obtenção das células mononucleares, figura de autoria própria. Processamento do sangue total diluído em PBS e separação por gradiente de densidade. Figura adaptada do protocolo de isolamento fornecido pela GE *healthcare*. **Abreviações:** *Endothelial basal media* (EBM-2) e *peripheral blood mononuclear cells* (PBMC).

Com a pipeta *Pasteur*, a camada branca de MNCs formada na interface foi aspirada e transferida para dois novos tubos cônicos, e duas lavagens foram realizadas, uma com PBS e a última com meio EBM-2, a fim de retirar as hemácias do *pellet*.

Após contagem celular, 1×10^6 /mL de células foram plaqueadas por poço em placa de 12 poços previamente tratada com colágeno. Dois mL de EGM-2 suplementado foi adicionado em cada poço, e as placas foram incubadas a 37 °C, com 5% de CO₂. O meio foi trocado todos os dias durante 1 semana para remoção das células não aderentes e, após isso, em dias alternados até o surgimento e confluência das colônias.

Após o surgimento das CEFCs, as células foram tripsinizadas e plaqueadas em placas de 6 poços: basicamente, após duas lavagens com 1 mL de PBS, adicionou-se 500 µL de Tripsina/EDTA 0,25% *phenol red* (cód. 25200056, Gibco – NY, EUA) por 2 minutos, a 37 °C, 5% CO₂. Para neutralizar a tripsina, foram adicionados 4 mL de meio EBM-2 suplementado com 10% de SFB. Após a centrifugação a 450 g por 5 minutos, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* resuspendido com 500 µL de meio suplementado e, posteriormente, transferido para uma nova placa de 6 poços com colágeno (cód. 3736, Corning – NY, EUA). Para expansão de colônia, as células foram tripsinizadas até a 3ª passagem, conforme esquema a seguir:

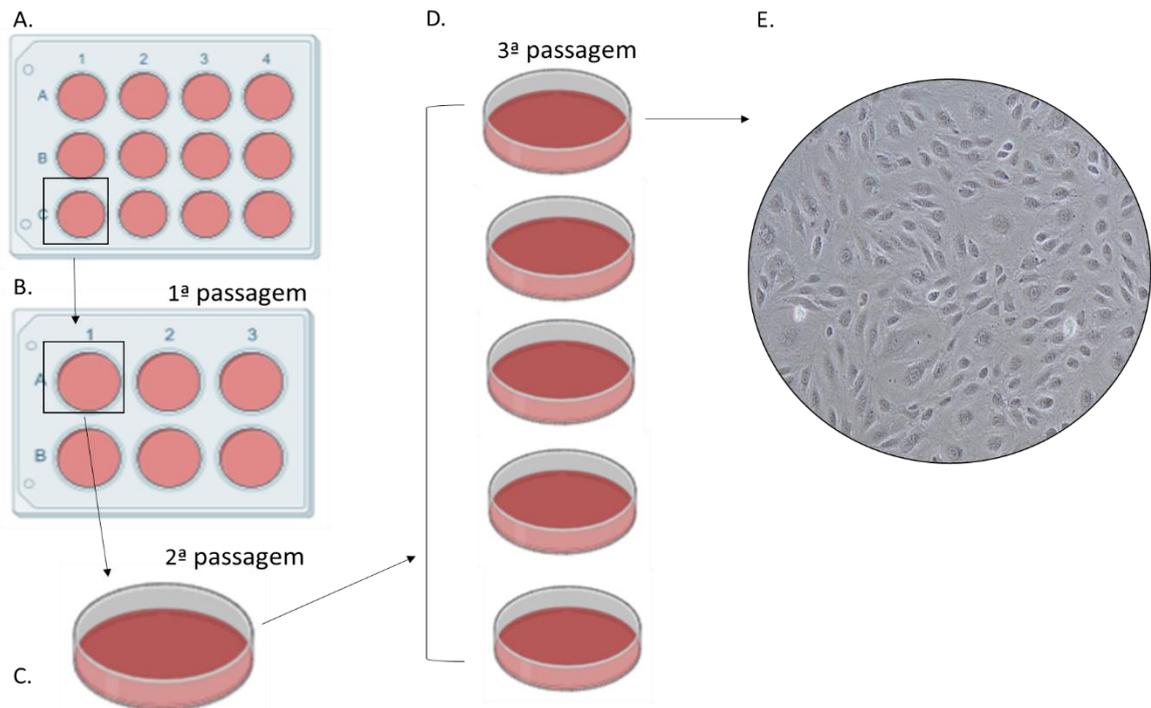


Figura 6. Representação esquemática da cultura de CEFCs, figura de autoria própria. Após o surgimento das CEFCs, estas foram redistribuídas em placas maiores para expansão celular. (A) placa de 12 poços, (B) placa de 6 poços, (C) 1 placa de 100 mm, (D) 5 placas de 100 mm e (E) Colônia de CEFCs em objetiva de 10X na 3ª passagem.

Para o congelamento, o processo de tripsinização foi realizado, e após a ressuspensão com meio, as células foram contadas: para cada 1 milhão de CEFCs, foi adicionado 1 mL de solução de congelamento (1 mL de DMSO [cód. D2650, Sigma - Darmstadt, Alemanha] + 9 mL de SFB). Após isso, *cryogenic vials* (cód. 430488, Corning – NY, EUA) identificados foram congelados no - 80 °C, utilizando o CoolCell LX (sistema que permite uma taxa de congelamento de - 1 °C por minuto, Corning), e depois de 24 horas, foram armazenados em tanque de nitrogênio líquido.

Para este estudo, consideramos o sucesso na obtenção das CEFCs quando estas chegaram até a etapa de congelamento celular. E, antes do congelamento, o sobrenadante das CEFCs na 3ª ou 4ª passagem foram aspirados e armazenados no freezer - 80 °C, bem como foram coletadas amostras de sobrenadante das culturas em que se mantiveram apenas as MNCs para análises posteriores.

3.8 Imunofenotipagem CEFCS - Citometria de Fluxo

Para caracterização fenotípica celular das CEFCS, realizamos citometria de fluxo com os anticorpos da empresa Biolegend, EUA. Primeiramente, houve uma titulação dos anticorpos, a fim de verificar o melhor volume a ser utilizado. Após essa definição, ficou padronizado o seguinte painel:

Tabela 3. Painel de anticorpos para marcação celular

TUBO 1	TUBO 2	TUBO 3
BRANCO	CD45 PerCp (2,5 µL)	CD34 FITC (5,0 µL)
	CD133 APC (5,0 µL)	CD309 PE (5,0 µL)
	CD31 FITC (5,0 µL)	CD144 PerCP (5,0 µL)
	CD146 PE (1,5 µL)	CD14 APC (5,0 µL)

Ao final da 3^a passagem e antes do congelamento, as células foram tripsinizadas, e após centrifugação, estas foram ressuspensas com PBS mais albumina de soro bovino (BSA). Cem microlitros da suspensão celular (contendo 2×10^5 células por tubo) foram distribuídos em tubo de poliestireno (cód. 352054, Corning – NY, EUA) e os anticorpos foram adicionados conforme o painel mencionado anteriormente.

Após 30 minutos de incubação a 4 °C e protegidas da luz, as amostras foram lavadas com PBS/BSA, centrifugadas a 450 g por 5 minutos (TA) e, em seguida, ressuspensas em 300 µL de paraformaldeído 1% em PBS para a aquisição de 20.000 eventos em citômetro de fluxo (FACS Calibur, BD - EUA). A análise dos dados foi realizada no *software* BD FlowJo™, versão 10.

3.9 Descongelamento das CEFCS

Os *vials* contendo CEFCS armazenados no tanque de nitrogênio foram descongelados rapidamente no banho maria a 37 °C. Após isso, foi realizada uma lavagem para remoção do DMSO residual, e as células foram transferidas para um tubo cônico de 15 mL e 5 mL de meio EBM-2, suplementado com 20% SFB. Em seguida, o tubo foi centrifugado a 450 g, por 5 minutos em temperatura ambiente.

Após rotação, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi ressuspendido em 500 µL de meio EBM-2 + SFB 20% e as células plaqueadas em uma placa de *petri* de 100 mm (código 430167, Corning – NY, EUA) contendo 10 mL de meio de cultura. Após confluência, as células foram tripsinizadas, transferidas para outras placas de *petri* de 100 mm e mantidas em cultura para utilização nos experimentos.

3.10 Ensaio no equipamento Incucyte Zoom™

O Incucyte ZOOM S3™ (Cód. 4647, Sartorius - Gottingen, Alemanha) é um sistema automatizado óptico de análise de células vivas que permite a observação e quantificação do comportamento celular através de imagens em tempo real. O *software* (versão 2019B) que acompanha o equipamento é dividido em duas partes: aquisição de imagens, e observação e análise das imagens adquiridas. Esta última consiste em selecionar, medir e avaliar as imagens adquiridas, gerando máscaras para uniformização dos dados.

O *software* também faz ensaios cinéticos, podendo avaliar o comportamento celular por longos períodos de dias a meses (até 2 meses), em pontos específicos selecionados pelo pesquisador, e permite análises mais robustas com a inclusão de fluorescência.

Proliferação

Para este ensaio, as CEFs na 5ª e 6ª passagem foram distribuídas em placas de 96 poços (1500/well), previamente tratadas com colágeno. Após 24 horas do plaqueamento, o sobrenadante foi removido e iniciou-se o tratamento das células com as seguintes condições:

- I. Meio EBM + SFB 10 % + heparina 5U
- II. Meio EBM + *Pool* de Plasma CN 10 % + heparina 5U
- III. Meio EBM + *Pool* de Plasma TVP agudo 10 % + heparina 5U

A troca dos tratamentos foi feita diariamente, no mesmo horário, por 4 dias, e o experimento foi conduzido em triplicata.

Para leitura no Incucyte®, a placa foi inserida no equipamento e as fotos foram tiradas nas seguintes configurações: Objetiva de 10x; Canal *phase*; tipo de *scan*

Standard e intervalo de 3 horas por foto, sendo 5 fotos por poço. Após a aquisição das imagens, a contagem celular foi realizada através da máscara gerada manualmente pelo próprio *software* do equipamento, o qual fornece uma porcentagem de confluência celular no decorrer dos dias.

Ao final do 4º dia, o sobrenadante do experimento foi coletado e armazenado no freezer – 80 °C para análises posteriores.

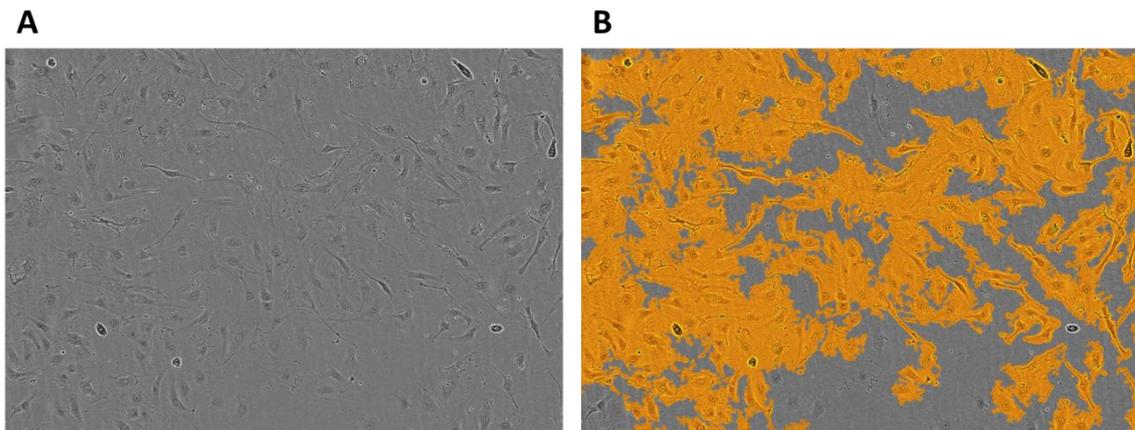


Figura 7. Máscara de análise de confluência das CEFCs com 6 horas de experimento no *software* Incucyte®. Figura representativa de análise apenas no contraste de fase (A) e com máscara gerada pelo software (B). Objetiva de 10X.

Apoptose

A apoptose foi avaliada através da utilização do marcador Anexina V-FITC (Cód. BMS306FI-300, Invitrogen – Vienna, Áustria), diluído 1/200 com um tampão específico (Cód. V13246, Invitrogen), constituído de 50 nM HEPES, 700 mM NaCl e 12,5 mM CaCl₂, pH 7,4.

Para a verificação da apoptose utilizamos 3 condições:

- I. Meio + SFB 10%
- II. Proteína humana recombinante *tumor necrosis factor alpha* (TNF- α) 5 ng/mL (Cód. 570104, Biolegend – EUA)
- III. Peróxido de hidrogênio (0,3mM) - controle positivo.

As diluições e concentrações de reagentes e densidade celular foram previamente estabelecidas em padronizações anteriores ao ensaio final.

Para o experimento, utilizamos placa de 96 poços previamente tratada com colágeno e células (2500/poço), nas 5ª e 6ª passagens. O ensaio ocorreu após adesão celular (no dia seguinte ao plaqueamento), e após remoção do meio de cultura, a Anexina e os tratamentos foram adicionados. A placa foi incubada por 30 minutos na incubadora a 37 °C, 5% CO₂, antes da primeira foto.

O experimento foi realizado em triplicata, nas seguintes configurações do Incucyte®: Objetiva de 10x; Canais *phase + green fluorescence*; tipo de *scan Standard* e intervalo de 3 horas por foto, sendo 5 fotos por poço. O experimento transcorreu por 3 dias, sendo que não houve troca de meio neste período.

Para análise, assim como no ensaio de proliferação, uma máscara é gerada para análise de confluência, bem como para a quantificação de células coradas em verde (células mortas). Para análise final, foram utilizados os dados do parâmetro “contagem de objetos verdes (Anexina V) / poço”, conforme ilustrado na figura 8.

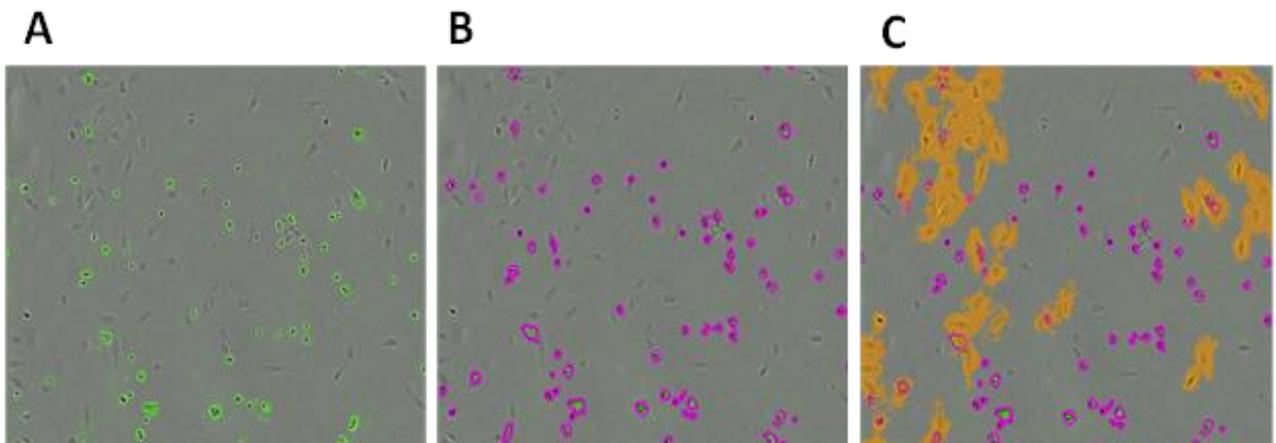


Figura 8. Máscara de análise para apoptose no software Incucyte®. Figura representativa das CEFCs no contraste de fase com fluorescência em verde (A), máscara gerada em rosa marcando os objetos em verde (B), e máscara cobrindo as células (confluência em amarelo) e células mortas (máscara rosa). Objetiva de 10X.

Migração – “arranhão”

Para o ensaio de migração, empregou-se a ferramenta *Wound maker* desenvolvida e adquirida pela própria empresa do Incucyte® (cód. 4563, Sartorius - Gottingen, Alemanha), que promove um arranhão na placa de forma padronizada, diferente do uso de ponteiros para ensaios de migração comumente empregados.

Esse experimento ocorreu em placa de 96 poços, e após as células atingirem confluência (plaqueadas inicialmente em 5000 células/poço), o arranhão foi realizado. As CEFCs desprendidas foram removidas através de uma lavagem com PBS. O meio + SFB 10% foi adicionado e a placa direcionada para primeira foto que compõe a máscara de análise *baseline*, figura 9. No Incucyte®, foi selecionado o módulo *wound healing*, objetiva de 10x; canais *phase*; intervalo de 3 horas por foto, sendo 2 fotos por poço. O experimento transcorreu por 3 dias, sendo que não houve troca de meio neste período.

O algoritmo de análise integrado na máscara de cada imagem tem o papel de identificar a posição das zonas feridas (livres de células) e não feridas (ocupadas por células), para fornecer a densidade relativa da ferida (RWD) durante o curso do experimento.

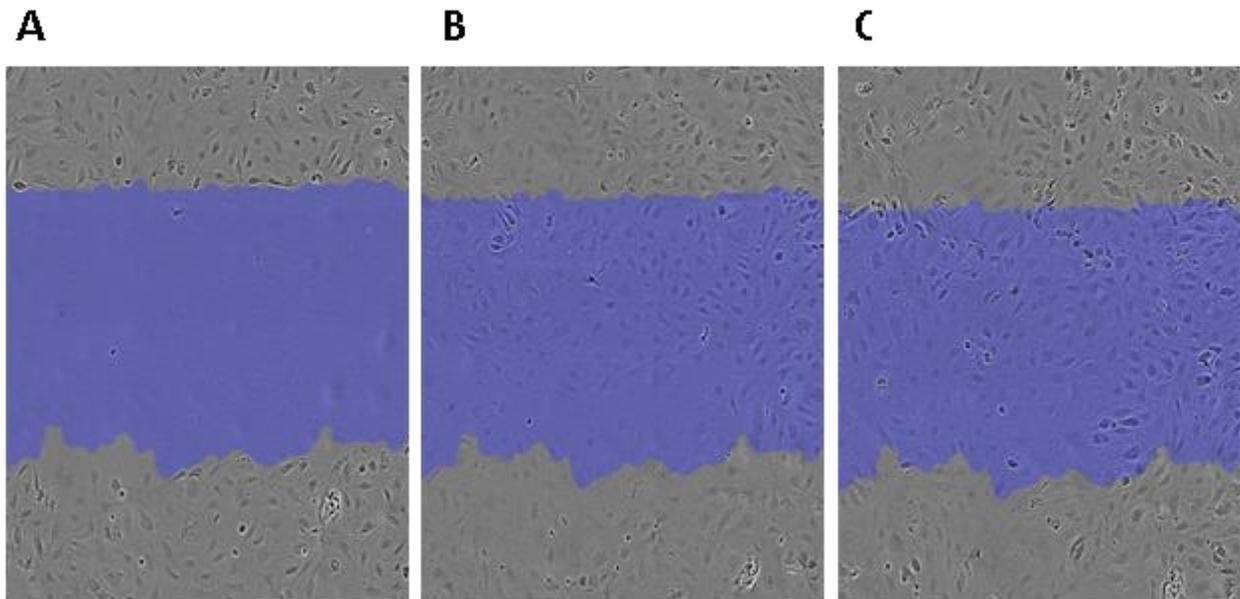


Figura 9. Máscara de análise para ensaio de migração das CEFCs no software Incucyte®. A máscara da ferida inicial gerada com o algoritmo de análise é sobreposta (área azul) e define os limites da ferida no tempo zero (A). Após 36h (B) e 72h (C) as células que migraram para região da ferida são marcadas pela máscara azul e os dados são fornecidos em densidade relativa da ferida.

Análise de senescência

As CEFCs em ambos os grupos foram analisadas quanto ao perfil de senescência através do kit *Senescence β -Galactosidase Staining* (cód 9860, Cell Signaling Technology – MA, EUA). Esse kit fornece os reagentes necessários para detectar a atividade de β -galactosidase em pH 6, uma característica conhecida das células senescentes. O protocolo de coloração seguiu-se de acordo com as informações indicadas pelo fabricante.

Ao final da coloração, as células plaqueadas em placas de 6 poços (2×10^5 /mL) foram fotografadas em 5 campos distintos, em microscópio invertido com a câmera fotográfica acoplada (Nikon Eclipse Ts2 – Tóquio, Japão). As imagens foram analisadas pelo *software* ImageJ, e a contagem de objetos corados em azul por CEFCs foi transformada em porcentagem.

3.11 Teste de geração de trombina (TGT)

O TGT em si avalia globalmente o processo da coagulação através do potencial de geração de trombina, a partir de um ativador da via tradicionalmente conhecida como via extrínseca, geralmente o fator tecidual (FT). Através de uma modificação da bula, o ensaio foi realizado com células, previamente aderidas em placa de 96 poços de fundo chato. Após algumas padronizações, o experimento final ocorreu em triplicata com 5000 células por poço nas condições:

- I. CEFCs CN vs CEFCs TVP sem uso de FT
- II. CEFCs CN vs CEFCs TVP com uso de FT

Este teste é baseado no monitoramento da fluorescência gerada pela clivagem do substrato fluorogênico pela trombina ao longo do tempo, após a ativação da cascata de coagulação por FT e fosfolípídeos no plasma. Através da mudança na fluorescência durante o teste, a concentração de trombina pode ser quantificada quando utilizado em paralelo um calibrador de trombina de concentração conhecida, que servirá como um controle para o teste.

Para o TGT utilizamos o kit da STAGO® (SP, Brasil) composto do plasma pobre em plaquetas (PPP/FT, cód. 86194), um calibrador (cód. 86192) e o reagente FluCa (cód. 86197). Os dois primeiros foram reconstituídos com 1 mL de água deionizada antes do uso, e o FluCa é uma solução pronta para uso, composta de substrato e cálcio. Após as CEFCs, o plasma CN (HemosIL®, cód. 0020003700 – MA, EUA) e o PPP já estarem na placa, o FluCa foi adicionado automaticamente pelo equipamento, e após 60 minutos de teste, o próprio *software* fornece os dados demonstrados na figura 10, de acordo com o cálculo baseado no calibrador.

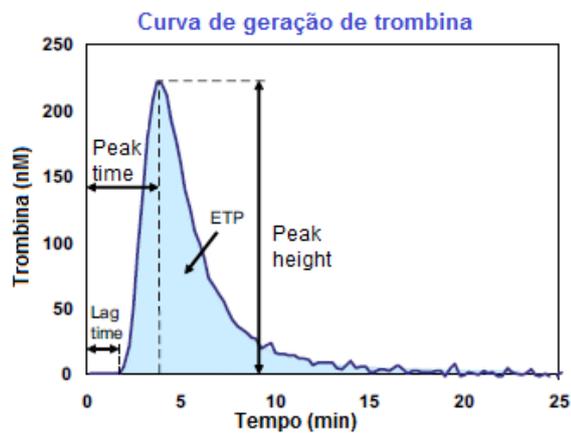


Figura 10. Esquema representativo dos parâmetros fornecidos pela curva de geração de trombina. Figura adaptada do artigo CASTOLDI, E.; ROSING, J. *Thrombin generation tests.* (72). **Abreviação:** Potencial de trombina endógena (ETP).

- O *Lag time* ou intervalo Lag representa o tempo transcorrido entre a adição do reagente e o início da geração de trombina e corresponde ao tempo de coagulação;
- ETP representa o potencial endógeno de trombina total formada (área sob a curva) resultante do equilíbrio entre procoagulantes (trombina formada) e inibidores da trombina. É usado como parâmetro para a previsão de risco de sangramento ou trombose;
- *Peak* (Pico) indica a taxa de formação de trombina até atingir o pico;
- *Peak time* and *Peak height* correspondem ao tempo para atingir o pico e a altura do pico, respectivamente.

3.12 Avaliação de marcadores plasmáticos e sobrenadante de cultivo celular

As amostras de plasma dos grupos 1-3 e os sobrenadantes dos experimentos de proliferação celular (grupo 2), e das culturas contendo apenas MNCs ou CEFCs (subanálise 2) foram analisadas através das tecnologias Luminex e Elisa:

- Luminex (MILLIPLEX® MAP) – Esta tecnologia se baseia na análise simultânea de múltiplas proteínas e uma quantificação de 100 analitos distintos em pequenos volumes de amostra, com alta especificidade, reprodutibilidade e sensibilidade. Em geral, o método é composto por *beads* magnéticas revestidas de anticorpos monoclonais específicos para a

proteína a ser determinada. Após a incubação *overnight*, a placa é então lavada, incubada com anticorpos de detecção e estreptavidina-ficoeritrina (PE) para a detecção final da fluorescência lida no instrumento Bio-plex 200 (Bio-Rad – CA, EUA) localizado no Laboratório Central de Tecnologias de Alto Desempenho em Ciências da Vida (LaCTAD). Os analitos analisados neste estudo estão descritos na tabela 4.

- Elisa (Quantikine®) – Este ensaio é baseado no método *sandwich* de duplo-anticorpo, em que os poços da microplaca já são revestidos com um anticorpo monoclonal específico para o analito de identificação. Após adição das amostras, é inserido o anticorpo policlonal conjugado com a enzima peroxidase de rábano. Essa ligação amostra e anticorpo é revelada através do cromógeno, que gera uma cor diretamente proporcional à quantidade de conjugado ligado ao anticorpo mensurada através do leitor de Elisa. Os valores de absorbância são calculados de acordo com a curva padrão.

Tabela 4. Analitos dosados em amostras de plasma e sobrenadante celular nos grupos 1-3

MÉTODO	ANALITO	CÓD, MARCA
LUMINEX	sVEGFR-2	HSCRMAG-32K, MILLIPLEX MAP - Millipore
LUMINEX	sICAM-1 e sVCAM-1	HAP1MAG-63K, MILLIPLEX MAP - Millipore
LUMINEX	sCD40L, IFN- γ , TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL8, IL-10, PDGF-AA/AB	HCYTA-60K, MILLIPLEX MAP - Millipore
ELISA	P-selectina	DPSE00, <i>Quantikine</i> R&D systems

Abreviações: Interleucina (IL); Fator de crescimento endotelial vascular, receptor 2 solúvel (sVEFR-2); Molécula de adesão intercelular solúvel 1 (sICAM-1); Molécula de adesão vascular solúvel 1 (sVCAM-1); Fator de necrose tumoral- α (TNF- α); Fator de crescimento derivado de plaqueta (PDGF); Interferon *gamma* (IFN- γ), e CD40 ligante solúvel (sCD40L).

3.13 Análise estatística

As variáveis numéricas foram testadas para verificar a normalidade através do teste Shapiro-Wilk através do programa *GraphPad Prism* versão 6.0. A comparação entre dois grupos com distribuição gaussiana foi realizada pelo teste t-Student.

Para comparação entre grupos e experimentos, as variáveis foram tratadas como não-paramétricas, e as comparações foram feitas pelos testes de Mann-Whitney ou Kruskal-Wallis (variáveis independentes). Correlações foram avaliadas pelo teste de Spearman, e no teste prospectivo (TVP aguda vs TVP>6 meses) foi utilizado o teste Wilcoxon pareado.

Os dados quantitativos foram expressos como mediana e percentis, além de média e desvio padrão. O nível de significância foi de $P<0.05$.

4. RESULTADOS

Conforme o desenvolvimento do projeto, o número amostral acabou variando de acordo com a inclusão dos pacientes e sucesso na obtenção das CEFCs. Portanto, inserimos o fluxograma abaixo para nortear as diferentes amostragens populacionais entre os grupos. No mais, importante ressaltar que as análises de CECs se iniciaram depois do início da captação dos pacientes com TVP na fase aguda, e por isso, não temos o grupo com o número amostral total. Além disso, alguns analitos ultrapassaram o limite de detecção e essa variação de número (n) foi expressa nas legendas das figuras inseridas nesta seção.

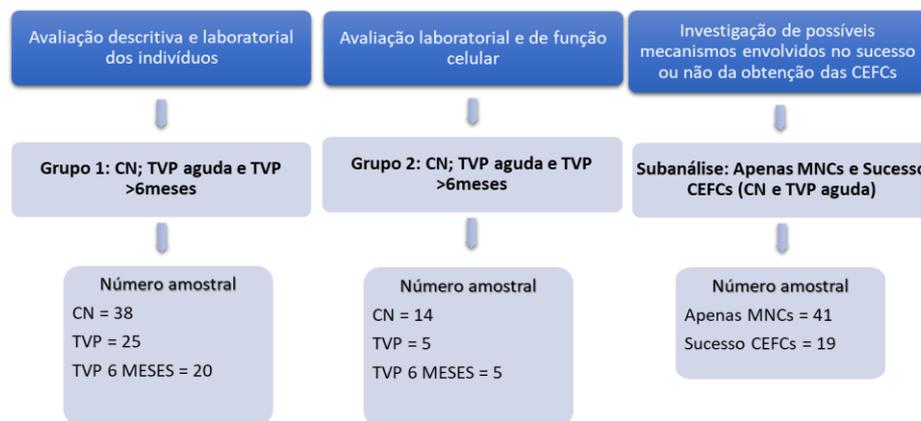


Figura 11. Fluxograma do grupo amostral entre os 3 grupos estudados. No esquema acima foram descritas o número de amostras avaliadas em cada grupo. **Abreviações:** Células formadoras de colônia circulantes (CEFCs); Controle (CN); Trombose venosa profunda (TVP) e Mononucleares (MNCs).

4.1. GRUPO 1

Durante o período de julho de 2019 a setembro de 2021 foi realizada a seleção dos casos de TVP aguda, do projeto ADVENTH-Campinas.

Foram notificados 203 casos de TVP aguda de membros inferiores, sendo que 178 não puderam ser incluídos, devido a presença de 1 ou mais fatores de exclusão, mencionados na tabela 5.

Tabela 5. Lista dos critérios de exclusão dos pacientes com TVP aguda

<i>Critério</i>	<i>Nº de casos</i>
Tabagismo	12
Neoplasia	43
Doença hepática / transplante recente	08
Doença autoimune ou imunossuprimido	15
Diabetes	26
Disfunção renal / transplante recente	17
Idade < 18 anos	7
Idade > 70 anos	39
Gestação	3
Passou do período de captação	20
Óbito	8
Não quis participar	18

Dentre os centros de captação, os 25 pacientes com TVP aguda selecionados para estudo foram na grande maioria provenientes de consultórios particulares (44%) e do hospital da PUC-Campinas (32%).

Como caracterização da coorte do grupo 1, a maioria dos pacientes são do sexo feminino (64%, n=16), com a idade média de 45 ± 13 anos e o índice de massa corpórea (IMC) de $29 \pm 4,5$ kg/m². A maioria dos casos (64 %, n=16) foi classificada como provocada por fatores de risco transitório maior ou menor, sendo que em 6 pacientes houve associação de pelo menos 2 fatores de risco (tabela 6). Os detalhes clínicos dos pacientes que foram incluídos no estudo estão descritos na tabela 7.

Tabela 6. Descrição dos pacientes com TVP aguda provocada e fatores de risco associados

Trombose provocada: Fatores de Risco n=16	
Transitório maior	nº de casos
Cirurgia com anestesia >30 minutos + imobilização parcial	N=4 (25%)
Transitório menor	
Uso de anticoncepcional oral	N=8 (50%)
Trauma, uso de gesso	N=2 (13%)
Internação hospital por pelo menos 3 dias	N=1 (6%)
Imobilização parcial + uso de anticoncepcional	N=1 (6%)

Além disso, foram selecionados 38 indivíduos saudáveis, sendo 8 (21 %) homens e 30 (79 %) mulheres. Estes apresentaram idade média de 36 ± 10 anos, e IMC de $24,3 \pm 6,9$ kg/m² (tabela 7). Apesar de haver diferença estatística entre os grupos em relação a alguns parâmetros, é importante ressaltar que esse não é o grupo final de análise de CEFCs, uma vez que não obtivemos sucesso em todos os experimentos para obtenção dessas células.

Tabela 7. Dados clínicos dos pacientes com TVP aguda e CN

	TVP aguda (n=25)	CN (n=38)	P
Idade <i>Média (± DP)</i>	45 (± 13,0)	36 (± 10,0)	0.003
Sexo <i>Mulher / homem</i>	64 % / 36 %	79 % / 21 %	0.38
IMC KG/M² <i>Mediana (IIQ)</i>	29 ± 4,7	24,3 ± 6,9	<0.001
TVP espontânea / provocada	32 % / 68 %	NSA	-
MID / MIE	40 % / 60 %	NSA	-
MID Distal: proximal	5:7	NSA	-
MIE Distal: proximal	4:8	NSA	-
Uso de anticoagulante	96 % (n=24)	4 % (n=1)	-
Trombose prévia <i>Há mais de 1 ano</i>	20 % (n=5)	NSA	-
Histórico familiar: TVP, AVC, IAM	43 % (n=10)	18 % (n=6)	0.06
HAS	16 % (n=4)	2,6 % (n=1)	0.07
Dislipidemia	12 % (n=3)	7,8 % (n=3)	0.67
Intervalo de dias do diagnóstico de TVP e coleta de sangue <i>Média (± DP)</i>	12 ±13.6	NSA	-

Abreviações: desvio padrão (DP); intervalo interquartil (IIQ); índice de massa corpórea (IMC); não se aplica (NSA) membro inferior direito (MID); membro inferior esquerdo (MIE); hipertensão arterial (HAS); trombose venosa profunda (TVP); controle (CN); acidente vascular cerebral (AVC); infarto agudo do miocárdio (IAM).

Hemograma

A Tabela 8 mostra os resultados em mediana e IIQ dos parâmetros hematológicos do grupo 1. Não foram observadas diferenças estaticamente significativas entre os componentes celulares.

Tabela 8. Parâmetros hematológicos dos grupos controle e TVP aguda

Hemograma	CN (n=35)	TVP aguda (n=23)	P*
Hemácias (<i>nº total x 10⁶/µl</i>)	4,6 (4,2 – 5,0)	4,5 (4,2 – 5,0)	0,55
Hemoglobina (<i>g/dL</i>)	13,8 (12,4 – 14,7)	13,9 (12,9 – 14,7)	0,97
Hematócrito (%)	41,0 (36,7 – 43,7)	42,10 (37,6 – 44,1)	0,77
Leucócitos (<i>nº total/µl</i>)	6100 (5300 – 6900)	7200 (4900 – 9080)	0,09
Neutrófilos (<i>x10³/µL</i>)	3,3 (2,4 – 4,0)	4,3 (2,7 – 5,4)	0,07
Linfócitos (<i>x10³/µL</i>)	2,2 (1,7– 2,5)	1,9 (1,5 – 2,3)	0,08
Monócitos (<i>x10³/µL</i>)	0,47 (0,4 – 0,6)	0,5 (0,4 – 0,7)	0,34
Plaquetas (<i>nº total/µl</i>)	248000 (190000 – 304000)	241000 (197000 – 3140000)	0,94

* Mann Whitney test; Valores representados em mediana e intervalo interquartil.

Abreviações: Controle (CN) e Trombose venosa profunda (TVP).

Dosagens plasmáticas

Em relação aos mediadores inflamatórios, notamos que os níveis de IL-6 e IL-8 no plasma dos pacientes com TVP aguda estavam aumentados significativamente quando comparados ao CN (IL-6: 0.9 [IIQ 0.4-1.7] vs. 3.5 [IIQ 1.5-8.9] pg/mL; IL-8: 0.9 [IIQ 0.5-1.3] vs. 1.3 [IIQ 0.9-1.8] pg/mL). No entanto, as outras interleucinas pró-inflamatórias TNF- α , IFN- γ , sCD40L e IL-1 β apresentaram medianas similares, e a IL-10 não foi detectada pelo teste Luminex, figura 12.

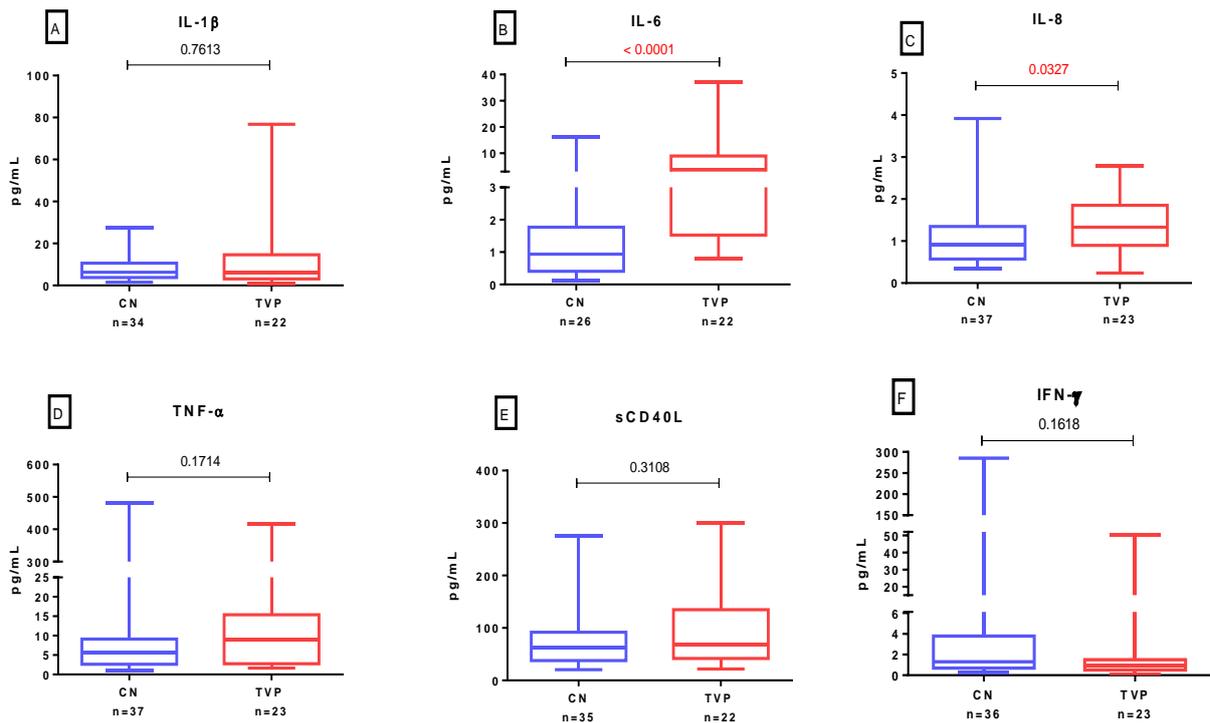


Figura 12. Mensuração de mediadores inflamatórios de pacientes com TVP aguda vs. CN. Observamos um aumento significativo das IL-6 e IL-8 no plasma do grupo TVP em relação ao CN, o número amostral de cada analito está descrito nos títulos dos grupos. Teste Mann Whitney. **Abreviações:** Controle (CN); Trombose venosa profunda (TVP); Interleucina (IL); Fator de necrose tumoral- α (TNF- α); Fator de crescimento derivado de plaqueta (PDGF); Interferon gamma (IFN- γ) e CD40 ligante solúvel (sCD40L).

Em relação às moléculas de adesão, observamos um aumento significativo da P-selectina na TVP aguda em relação ao CN (34.9 [IIQ 31.4 – 36.3] vs. 35.9 [IIQ 33.7-43.5] ng/mL), e uma diminuição não significativa de sICAM-1e sVCAM-1, figura 13.

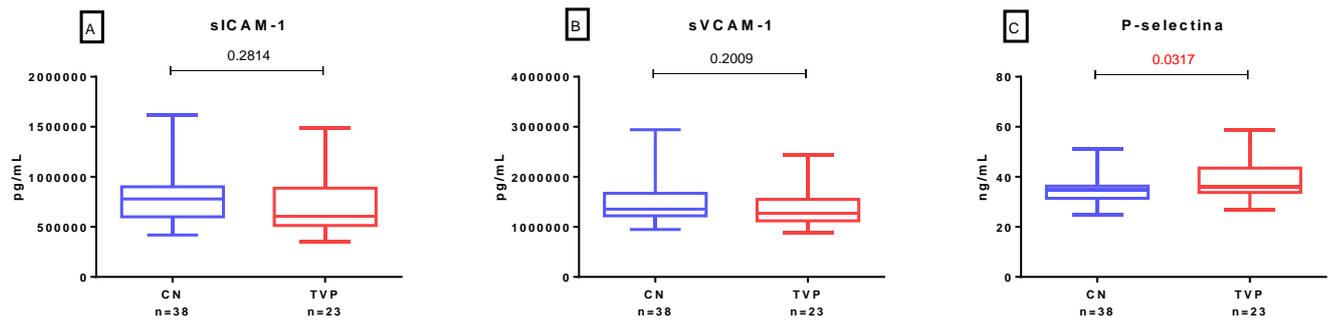


Figura 13. Níveis de moléculas de adesão solúveis no plasma de pacientes com TVP aguda vs CN. Conforme as análises por Luminex e Elisa, observamos um aumento significativo da P-selectina no grupo TVP aguda, Teste Mann Whitney. **Abreviações:** Controle (CN); Trombose venosa profunda (TVP); Molécula de adesão intercelular solúvel 1 (sICAM-1); Molécula de adesão vascular solúvel 1 (sVCAM-1);

Também observamos um aumento significativo do fator de crescimento PDGF-AA/AB no grupo TVP aguda em relação aos indivíduos saudáveis (3472 [IIQ 2285-6415] pg/mL vs. 5479 [IIQ 3862-7455] pg/mL, $p=0,037$), e uma diminuição não significativa no receptor solúvel do VEGFR2 4744 (IIQ 3715-6437) vs. 3756 (IIQ 1547-7875) pg/mL, $p=0,85$.

Quantificação das CECs

A frequência das CECs estava aumentada nos pacientes TVP aguda, com 5.7 (IIQ 2.7-9.0) vs. 2.6 (IIQ 1.2-4.1) / μ L em relação ao grupo CN, $p=0,02$. No grupo TVP aguda demonstrou-se uma correlação negativa com os níveis de sVCAM-1, $p=0,03$, figura 14. Também verificamos nesse mesmo grupo uma correlação negativa de CECs e IL-8, com $R^2=-0.87$ e $p=0.03$. Não se observou nenhuma outra correlação significativa nas diversas análises.

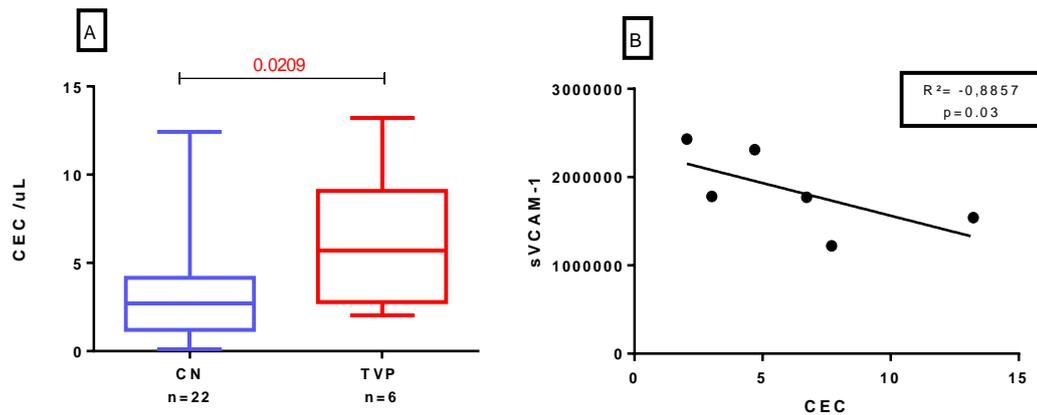


Figura 14. Frequência celular das CECs e correlação com sVCAM-1. A figura A representa as avaliações das CECs por citometria de fluxo, com um aumento significativo no número de CECs no grupo TVP aguda. Foi observada uma correlação negativa com sVCAM-1 em relação ao número de CECs representada pela figura B, testes Mann Whitney e tese de correlação Spearman. **Abreviações:** Controle (CN); Trombose venosa profunda (TVP); Célula endotelial circulante (CEC); Molécula de adesão vascular solúvel 1 (sVCAM-1);

Análise prospectiva: TVP aguda e TVP >6meses

Dos 25 pacientes incluídos na fase aguda, não conseguimos repetir a segunda coleta em 5 pacientes (20%): 2 não quiseram participar, 1 paciente engravidou e 2 estavam impossibilitados de comparecer ao Hemocentro devido a pandemia COVID-19. A mediana do intervalo entre a 1ª e 2ª coletas foi de 7 meses, IIQ 6-8.

As características clínicas dos 20 pacientes remanescentes são: 65% mulheres (n=13) e 35% (n=7) homens, com 50% ainda fazendo uso de anticoagulantes, sem nenhum episódio de recorrência. Pela classificação de Vilalta de SPT, 11 (55%) pacientes não apresentavam essa complicação, 7 (35%) discreta, 1 (5%) moderada e 1 (5%) grave.

Hemograma

Em relação aos parâmetros hematológicos, observamos que não houve mudanças significativas entre os grupos, porém algumas medianas diminuíram após os 6 meses de fase aguda, tabela 9.

Tabela 9. Parâmetros hematológicos dos grupos TVP aguda e *follow-up*

Hemograma	TVP aguda (n=19)	6 meses após TVP (n=19)	p*
Hemácias ($\times 10^6/\mu\text{L}$)	4.5 (4.3 – 4.9)	4.5 (4.3 – 4.8)	0.61
Hemoglobina (g/dL)	13.9 (13.1 – 14.6)	14.2 (13.1 - 14.9)	0.66
Hematócrito (%)	42.1 (38.8 – 43.6)	41.7 (39.7 – 43.6)	0.67
Leucócitos (nº total/ μL)	7200 (5500 – 9000)	5975 (5265 – 6825)	0.09
Linfócitos ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	2.0 (1.5 – 2.3)	2.0 (1.4 – 2.5)	0.52
Neutrófilos ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	4.3 (2.9 – 5.0)	3.2 (2.9 – 4.6)	0.38
Monócitos ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	0.5 (0.4 – 0.7)	0.5 (0.3 – 0.6)	0.15
Plaquetas (nº total/ μL)	265.000 (200.000 – 342.000)	254.000 (204.000 – 289.000)	0.06

* Teste Wilcoxon pareado; Valores representados em mediana e intervalo interquartil.

Abreviação: Trombose venosa profunda (TVP).

Dosagens plasmáticas

A avaliação prospectiva dos marcadores inflamatórios nos permitiu verificar a inversão das IL-6 e IL-8, apenas significativa para IL-6, de 3.7 (IIQ 1.7-10.7) para 1.7 (IIQ 0.5-2.9) pg/mL, conforme demonstrado na figura 15 (b). A IL-10 manteve-se sem detecção.

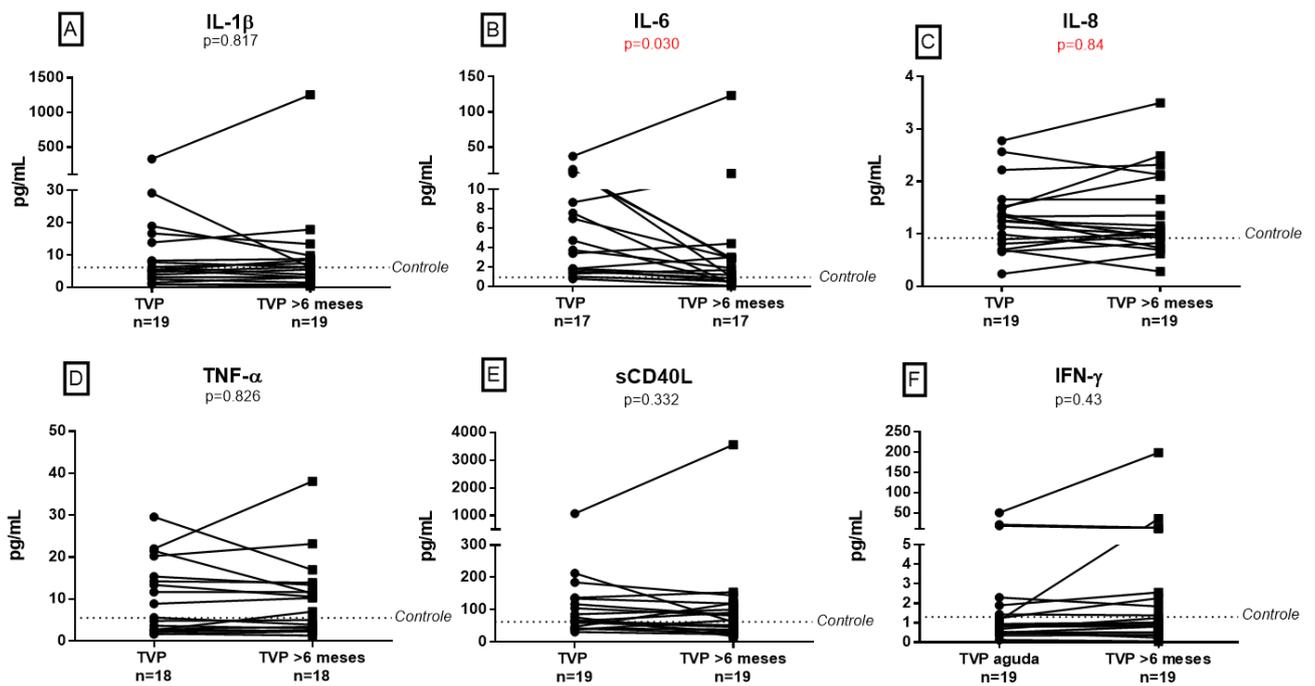


Figura 15. Mensuração de mediadores inflamatórios de pacientes com TVP aguda vs. TVP >6 meses. Observamos uma diminuição significativa da IL-6 no plasma do grupo TVP crônica, o número amostral de cada analito está descrito nos títulos dos grupos. Teste Wilcoxon pareado. **Abreviações:** Controle (CN); Trombose venosa profunda (TVP); Interleucina (IL); Fator de necrose tumoral- α (TNF- α); Fator de crescimento derivado de plaqueta (PDGF); Interferon gamma (IFN- γ) e CD40 ligante solúvel (sCD40L).

Ademais, em relação as moléculas de adesão, verificamos um padrão de inversão, com a P-selectina, diminuindo de 36.3 (IIQ 33.7-44.5) para 33.9 (IIQ 28.4 – 35.6) ng/mL, $p=0,001$; e aumento dos níveis de sICAM-1 (agudo: 575536 [IIQ 512487 – 8166379] e >6 meses: 790820 [IIQ 624625 – 966992]) e sVCAM-1 (1.23×10^6 [1.0×10^6 - 1.4×10^6] vs 1.62×10^6 [1.2×10^6 - 1.7×10^6]), figura 16. O PDGF-AA/AB demonstrou medianas parecidas com a fase aguda (5374 e 5479 pg/mL) e o sVEGFR2 não foi detectado em um número suficiente de amostras para a realização de comparações.

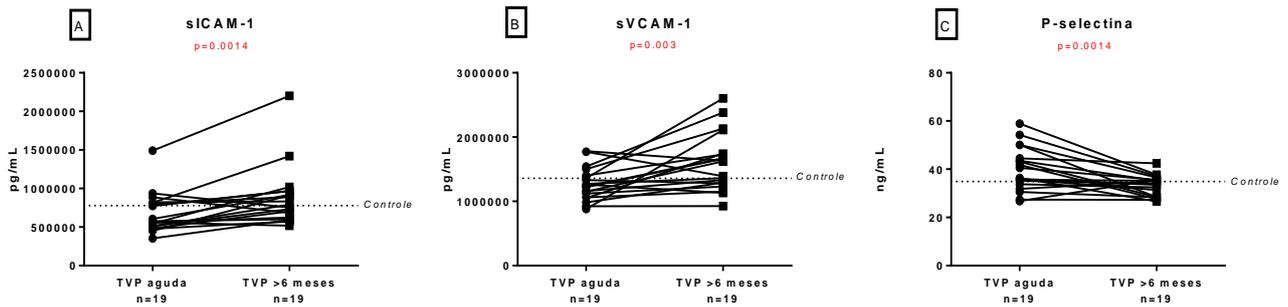


Figura 16. Níveis de moléculas de adesão solúveis no plasma de pacientes com TVP aguda vs TVP >6 meses. Conforme as análises prospectivas por Luminex e Elisa, observamos uma diminuição significativa da P-selectina e aumento das moléculas sICAM-1 e sVCAM-1 na TVP crônica, o grupo CN serviu como valores *baseline*. Teste Wilcoxon pareado. **Abreviações:** Controle (CN); Trombose venosa profunda (TVP); Molécula de adesão intercelular solúvel 1 (sICAM-1); Molécula de adesão vascular solúvel 1 (sVCAM-1).

Quantificação das CECs

Apesar do pequeno número de casos para pareamento para avaliação prospectiva da frequência das CECs, pudemos observar uma diminuição dessas células pós fase aguda de 7.2 (IIQ 3.9-11.8) para 4.1 (IIQ 3.3-4.4) / μL , mas não significativa. Essa mediana parece ser ainda maior que os CNs com frequência de 2.9 (IIQ 1.2-4.1) / μL , figura 17.

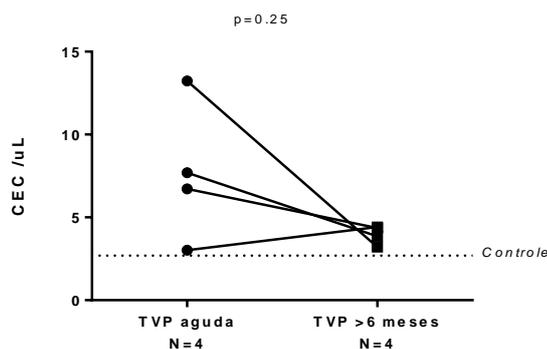


Figura 17. Frequência prospectiva de CECs nos grupos TVP aguda e TVP follow-up. A contagem de CECs demonstrou estar reduzida pós 6 meses o diagnóstico de TVP, porém observamos ainda observamos um aumento em relação ao controle. Teste Wilcoxon pareado. **Abreviações:** Controle (CN); Trombose venosa profunda (TVP); Célula endotelial circulante (CEC).

4.2. GRUPO 2

O grupo 2 é composto daqueles em que as CEFCs atingiram 3^a e 4^a passagem e foram congelados pelo menos um *vial* com $1,0 \times 10^6/\text{mL}$.

Estabelecimento das CEFCs

Em geral, nas primeiras semanas, foi observado o surgimento das células endoteliais progenitoras (CEPs), que devido à baixa capacidade proliferativa desapareceram ao longo da cultura. Já as primeiras colônias de CEFCs com a morfologia *cobblestone* – característica de células endoteliais maduras (figura 18) – foram observadas com uma média de 14 (± 4) dias de cultura. Ao todo, do isolamento até o congelamento foram uma média de 35 dias (± 10 dias). Observamos que para ambos os grupos, o surgimento tardio de colônias era impactante no sucesso do isolamento das CEFCs, uma vez que elas se alteravam morfológica e fenotipicamente.

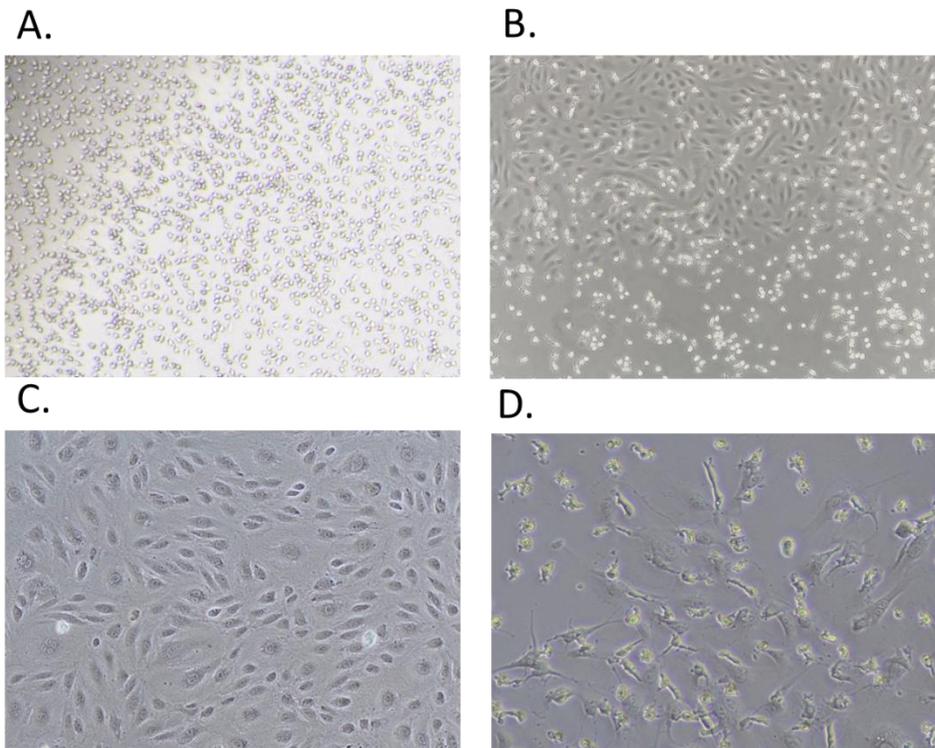


Figura 18. Estabelecimento e caracterização morfológica das CEFCs. Células mononucleares de indivíduo saudável 3 dias após o plaqueamento figura (A), CEPs e início de colônia de CEFCs com morfologia cobblestone (B), CEFCs confluentes na 3ª passagem (C) e CEFCs com mudança de morfologia e baixa proliferação (D). Imagens representativas obtidas em microscópio invertido e em objetiva de 10X.

As CEFCs surgiram em amostras de 19 (50 %) indivíduos saudáveis, no entanto apenas 14 chegaram na 3ª passagem (37% de sucesso nos CN); e para os pacientes com TVP aguda surgiram colônias de CEFCs em de 13 dos 25 pacientes coletados, porém conseguimos o congelamento de apenas 5 pacientes, representando um sucesso de 20%.

No geral o grupo CN apresentou idade média 36 ± 12 anos e o grupo TVP aguda apresentou 49 ± 16 anos ($p=0.13$). Os outros dados clínicos e laboratoriais estão descritos na tabela 10.

Tabela 10. Dados dos indivíduos CN e TVP aguda que obtiveram sucesso no isolamento das CEFCs

	CN N=14	TVP Aguda N=5	P*
Gênero <i>Mulher / homem</i>	13:1	4:1	0.4
Idade <i>Média (± DP)</i>	36 ± 12 anos	49 ± 16 anos	0.13
IMC KG/M² <i>Mediana (IIQ)</i>	23.0 (20.5 – 26,5)	30.0 (22.0 – 35.0)	0.23
Leucócitos <i>(nº total/µl)</i>	5940 (4650 – 6900)	4800 (4700 – 6100)	0.46
Fator de risco transitório menor <i>Uso de anticoncepcional</i>	NA	2 (40%)	-
Uso de anticoagulantes	1	5	
Tempo de surgimento das CEFCs <i>Dias, média</i>	14 ± 3.9	13 ± 2.3	> 0.9
Tempo entre coleta e congelamento <i>Dias, mediana</i>	34 (28 – 42)	35 (27 – 51)	0.79

*Teste Mann Whitney. **Abreviações:** Intervalo interquartil (IIQ); Desvio padrão (DP); Índice de massa extracorpórea (IMC); Células endoteliais formadoras de colônias (CEFCs); Controle (CN); Trombose venosa profunda (TVP).

Imunofenotipagem das CEFCs

Antes do congelamento das CEFCs nas 3^a e 4^a passagens, foi realizada uma marcação de receptores extracelulares a fim de caracterizar as células como CEFCs. Observamos que estas são positivas para marcadores endoteliais (CD146, CD31, CD309 e CD144), mas com baixa positividade celular dos marcadores de célula progenitora endotelial (CD133, CD34), de leucócitos (CD45) e monócitos (CD14), tabela 11.

Tabela 11. Caracterização das CEFCS por citometria de fluxo

	CN N=14	TVP AGUDA N=5	P*
CD34 (%)	21.05 (12.3 – 62.7)	23.9 (13.5 – 85.1)	0.39
CD309 (%)	93.1 (89.2 – 95.0)	91.7 (68.5 – 93.6)	0.38
CD144 (%)	86.3 (51.9 – 94.1)	91.0 (79.8 – 95.9)	0.44
CD14 (%)	8.4 (4.1 – 21.9)	18.8 (7.2 – 36.0)	0.44
CD31 (%)	92.5 (87.5 – 97.8)	90.7 (61.7 – 92.3)	0.32
CD146 (%)	98.8 (94.6 – 99.5)	96.6 (91.4 – 99.4)	0.63
CD45 (%)	7.5 (3.2 – 15.4)	2.5 (1.3 – 41.4)	0.64
CD133 (%)	2.89 (0.9 – 15.9)	3.5 (0.9 – 56.6)	0.68

*Teste Mann Whitney. Valores representados em mediana e intervalo interquartil.

Abreviações: Controle (CN) e Trombose venosa profunda (TVP).

Avaliação de função endotelial

Proliferação

Para avaliar a capacidade proliferativa destas células, foram realizados ensaios de porcentagem de confluência registrado pelo Incucyte®. Observamos medianas inferiores no grupo TVP aguda quando comparado ao CN, principalmente nas primeiras 18 horas, porém estas diferenças não foram significativas conforme demonstrado na figura 19. Para análise deste experimento, os dados foram normalizados com o tempo 0h e uma tabela foi inserida como Anexo 3A.

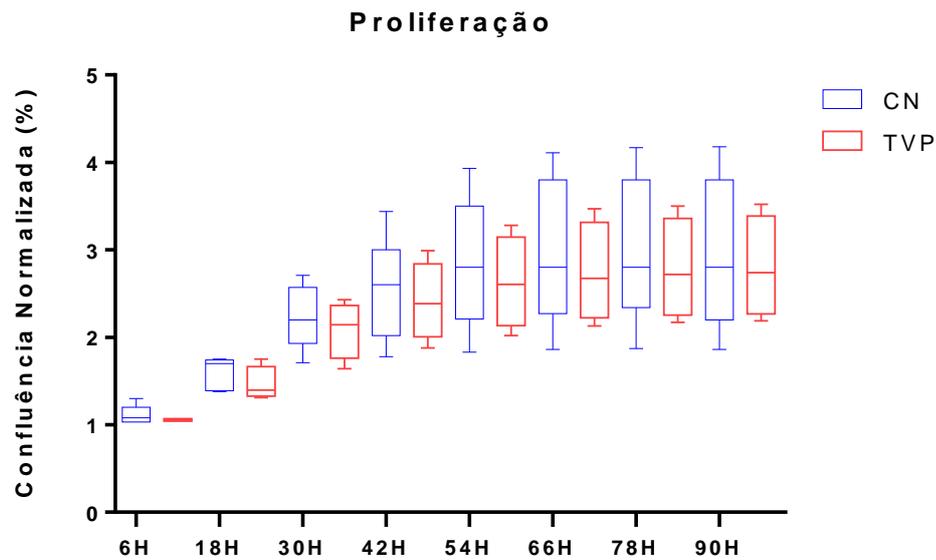


Figura 19. Ensaio de Proliferação no equipamento Incucyte®. O *box-plot* azul representa CEFCs CN e em vermelho CEFCs TVP. O experimento foi feito em triplicata com n=7 no grupo CN e n=4 no grupo TVP e uma duração de 4 dias. Teste Mann-Whitney. **Abreviações:** Controle (CN); Trombose venosa profunda (TVP) e Horas (H).

Quando avaliamos o impacto do estímulo plasmático do grupo CN e de TVP aguda na função endotelial dos indivíduos saudáveis, observamos que estas diminuem a capacidade proliferativa significativamente nas primeiras 18 horas na presença do plasma de TVP (figura 20). Observou-se que somente 2 dias após o plaqueamento a atividade replicativa entre os grupos foi semelhante.

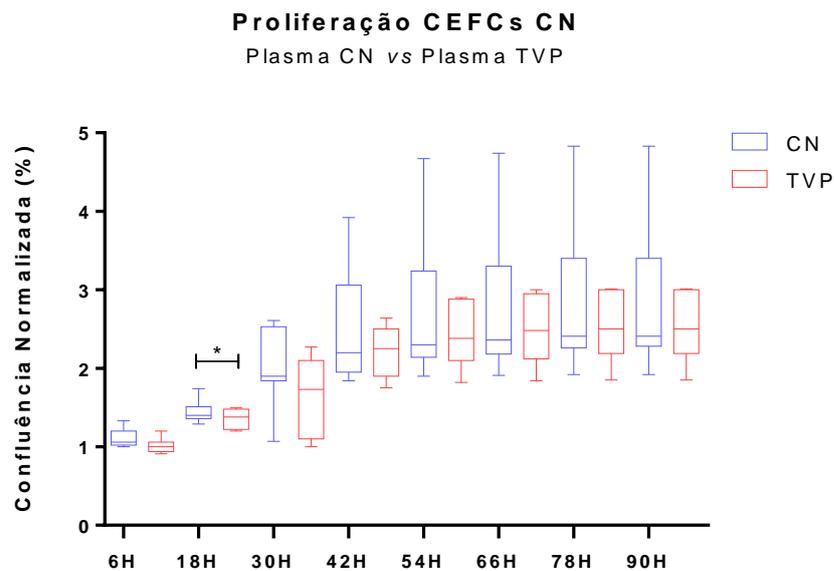


Figura 20. Avaliação do efeito plasmático sobre ensaio de proliferação em CEFCs CN. O *box-plot* azul representa *pool* plasma do grupo CN e em vermelho CEFCs TVP. O experimento foi feito em triplicata com $n=7$ e uma duração de 4 dias. Teste Wilcoxon pareado e $p=0,03$. **Abreviações:** Controle (CN); Trombose venosa profunda (TVP) e Horas (H).

Migração – “arranhão”

Os dados do ensaio de migração celular demonstraram uma superioridade das CEFCs do CN em relação as de TVP aguda, e nas primeiras 6 horas após o “arranhão”, o grupo CN apresentou um percentual de 39.8% vs 27.6% nas CEFCs TVP aguda ($p=0.05$). Da mesma forma que no experimento de proliferação, após 2 dias, houve uma semelhança entre os 2 grupos. Os dados de todo experimento encontram-se na tabela Anexo 3B.

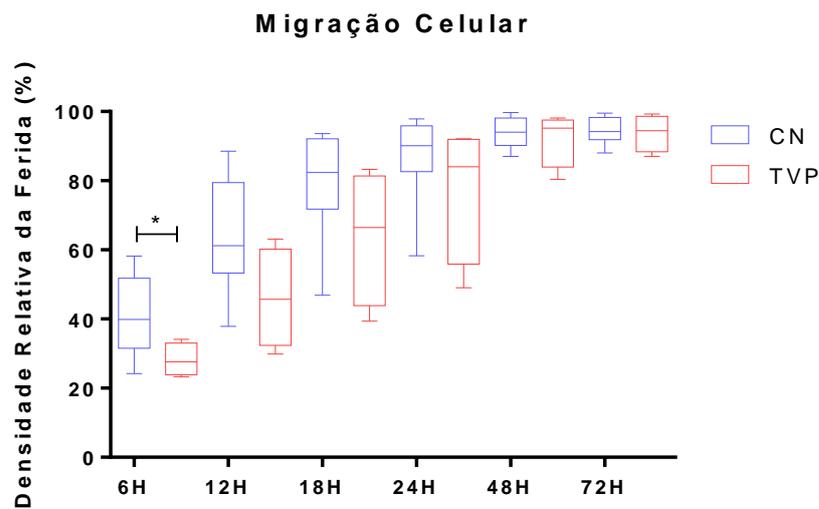


Figura 21. Ensaio de migração no equipamento Incucyte®. Aumento na atividade reparativa das CEFCs CN nas primeiras 6 horas quando comparado ao grupo TVP aguda. Experimento conduzido em triplicata com duração de 3 dias, n=10 no grupo CN e n=4 no grupo TVP. Teste Mann-Whitney e p=0.05. **Abreviações:** Controle (CN); Trombose venosa profunda (TVP) e Horas (H).

Apoptose

No ensaio de apoptose o uso do peróxido de hidrogênio 0,3mM como controle positivo atesta a funcionalidade do teste. Observamos aumento de objetos contados em verde no grupo TVP aguda, embora não significativo. O mesmo foi verificado com a utilização de TNF- α , figura 22. Os dados descritivos dos 3 dias de experimento encontram-se anexados ao final da tese como anexo 3C.

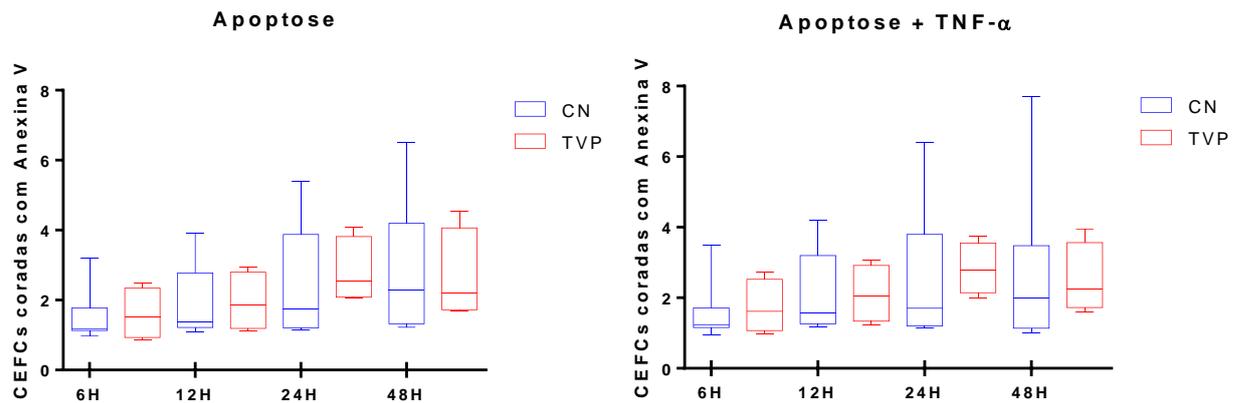


Figura 22. Ensaio de apoptose no equipamento Incucyte® após distintos tratamentos celulares. Figura à esquerda representa condição basal (Meio+ SFB 10%) e à direita estímulo inflamatório (Meio + TNF- α 5 ng/mL) nas CEFCs de grupo CN e TVP. O teste foi feito em triplicata com n=8 no grupo CN e n=4 no grupo TVP. Teste Mann-Whitney. **Abreviações:** Controle (CN); Trombose venosa profunda (TVP); Fator de necrose tumoral- α (TNF- α); e Horas (H).

Senescência celular

Após coloração das células senescentes com o kit de β -Gal, verificou-se uma similaridade nas porcentagens de células coradas em ambos os grupos, figura 23.

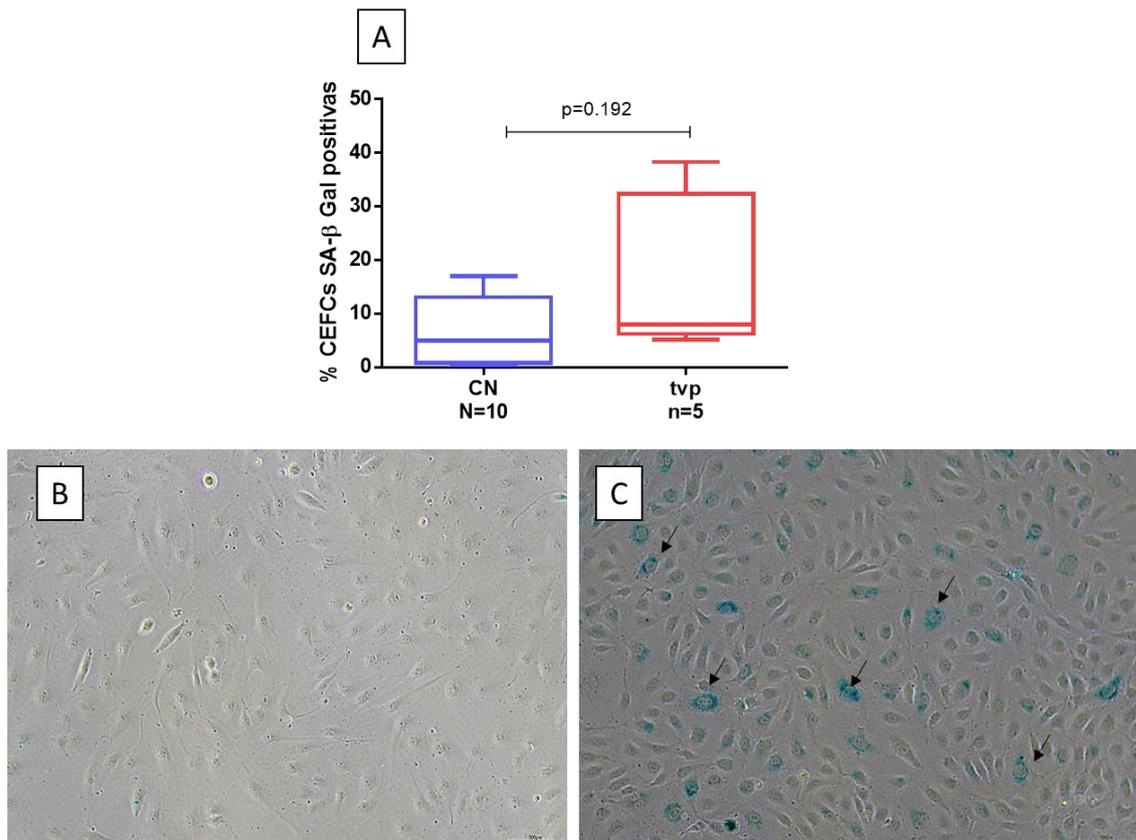


Figura 23. Senescência celular representada por células coradas com SA-β Gal. Figura A demonstra aumento de CEFCs senescentes no grupo TVP aguda comparado com CEFCs CN. Imagens representativas na objetiva de 10X pelo microscópio invertido sendo B um campo com CEFCs sem coloração e C com positividade para senescência. O teste foi realizado em simplicata com 5 fotos por poço. Teste Mann Whitney. **Abreviações: Controle (CN) e Trombose venosa profunda (TVP).**

Interface com a hemostasia – TGT CEFCs

Realizamos o TGT em CEFCs previamente plaqueadas, e com uma condição basal para ambos os grupos através do uso de um plasma controle calibrador e avaliamos o potencial da geração de trombina sem adição de FT em um primeiro momento.

Os dados revelaram que o FT presente na membrana da célula endotelial foi capaz de gerar a formação de trombina e esses valores foram amplificados quando adicionado o FT, (tabela 12). Não observamos alterações significativas entre os grupos, no entanto o grupo CEFCs TVP demonstraram ETP e pico menores, apesar de um intervalo Lag mais curto.

Além disso, a presença das CEFCS naturalmente altera os valores da geração de trombina quando comparados apenas com o plasma CN calibrador: Intervalo Lag de $3,96 \pm \text{min}$; ETP $1621,6 \pm 232,3 \text{ nM}\cdot\text{min}$; Pico de $314,9 \pm 50,2 \text{ nM}$; Tempo para pico de $6,5 \pm 0,46 \text{ min}$ e Índice de velocidade $129,8 \pm 35,0 \text{ nM}/\text{min}$, $n=7$.

Tabela 12. Teste de geração de trombina em CEFCS CN e TVP aguda

GRUPOS	CEFCS sem FT	CEFCS com FT
Intervalo Lag (min)		
CN (n=9)	8.8 (5.8 - 13.0)	4.5 (4.1 - 5.0)
TVP AGUDA (n=4)	8.0 (5.4 - 12.6)	4.3 (4.2 - 4.8)
P*	0.43	0.43
ETP (nM.min)		
CN (n=9)	620.6 (455.1 - 780.2)	1460 (1306 - 1703)
TVP AGUDA (n=4)	467 (189.8 - 543.4)	1432 (1216 - 1629)
P*	0.26	0.54
Pico (nM)		
CN (n=9)	44.2 (30.8 - 67.7)	237.2 (165.4 - 274.6)
TVP AGUDA (n=4)	34.62 (25.0 - 42.8)	204.7 (189.1 - 256.3)
P*	0.26	0.85
Tempo para pico (min)		
CN (n=9)	16.0 (11.6 - 19.8)	8.3 (7.0 - 9.2)
TVP AGUDA (n=4)	15.5 (14.0 - 21.5)	7.9 (7.1 - 8.8)
P*	0.71	0.85
Índice de velocidade (nM/min)		
CN (n=9)	6.8 (4.3 - 13.5)	72.59 (41.0 - 100.4)
TVP AGUDA (n=4)	4.7 (2.4 - 6.9)	52.45 (51.4 - 94.5)
P*	0.26	0.85

*Teste Mann Whitney. Valores representados em mediana e intervalo interquartil.

Abreviações: Endogenous thrombin potential (ETP); Fator tecidual (FT); Controle (CN) e Trombose venosa profunda (TVP).

Análises plasmáticas e de sobrenadante celular

Quando avaliado os níveis plasmáticos das citocinas do grupo 2, não encontramos diferenças significativas entre CN e TVP aguda, figuras 24 e 25.

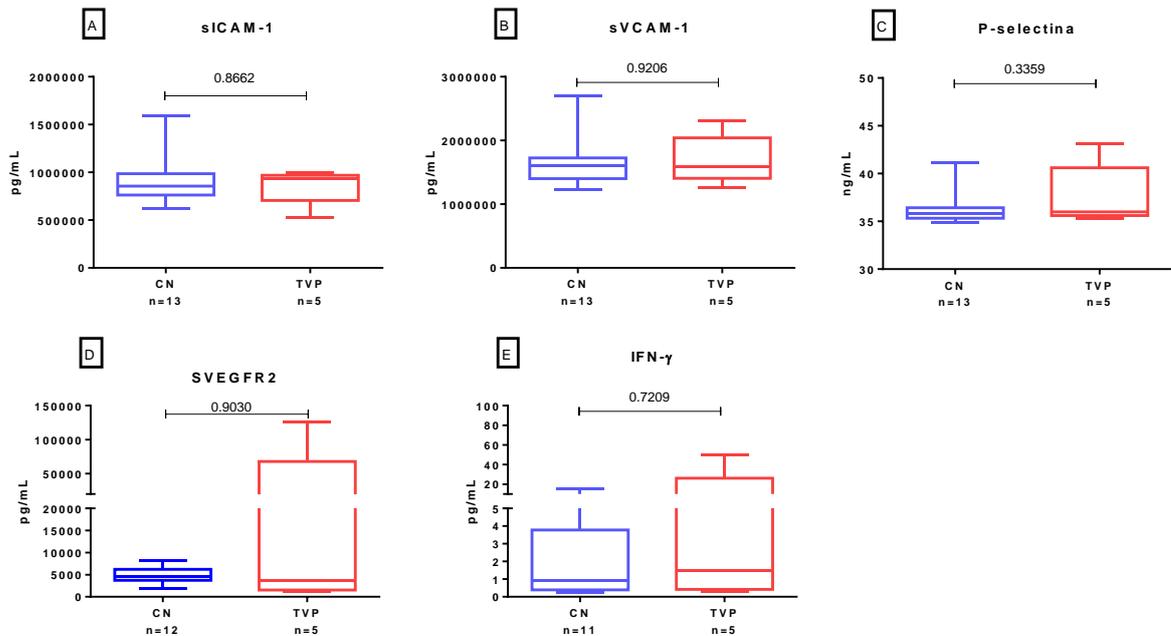


Figura 24. Mensuração de mediadores solúveis no plasma de pacientes com TVP aguda e CN – grupo 3. Observamos similaridade entre os grupos em todos os analitos, Teste Mann Whitney. **Abreviações:** Controle (CN); Trombose venosa profunda (TVP); Interferon gamma (IFN- γ); Molécula de adesão intercelular solúvel 1 (sICAM-1); Molécula de adesão vascular solúvel 1 (sVCAM-1) e Fator de crescimento endotelial vascular, receptor 2 solúvel (sVEGFR-2).

Apesar dos níveis de IL-6 e IL-8 circulantes do grupo com TVP apresentarem medianas aumentadas em relação ao CN, com os valores IL-6 1.1 (IQ 0.2-58.7) vs 2.8 (IIQ 0.8-22.8) pg/mL e IL-8 1.0 (IIQ 0.6-1.4) pg/mL no CN e 1.4 (1.1-2.5) pg/mL na TVP aguda, estes não são significativos, figura 25.

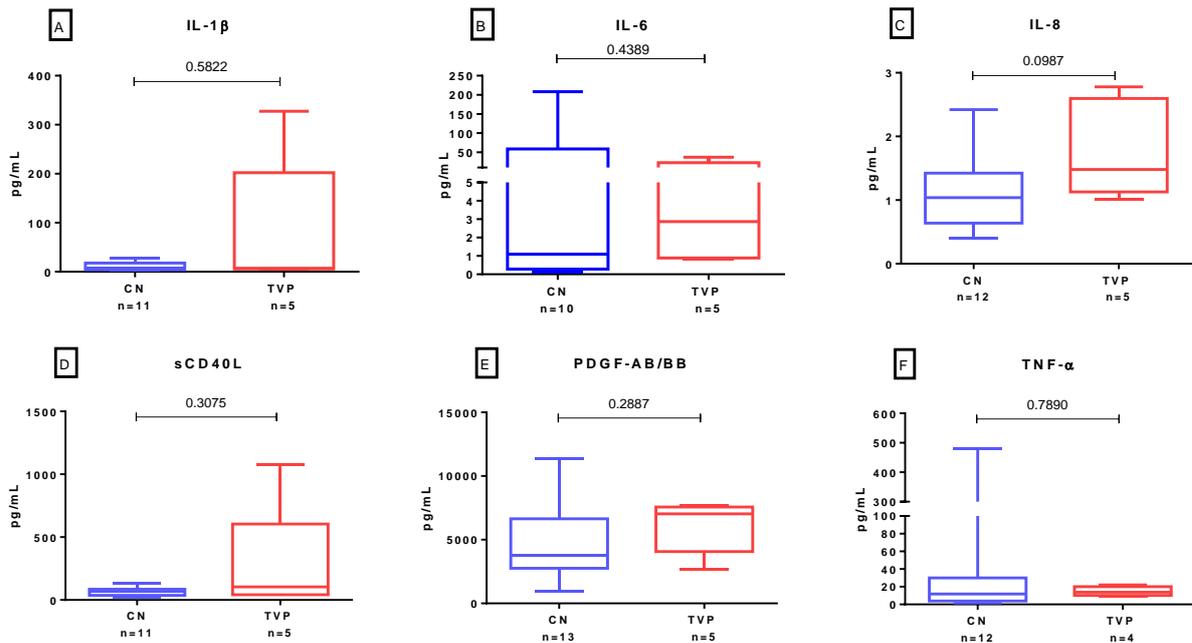


Figura 25. Mensuração de mediadores solúveis no plasma de pacientes com TVP aguda vs. CN – grupo 3. Níveis aumentados não significativos de IL-6 e IL-8 no grupo de TVP aguda, Teste Mann Whitney. **Abreviações:** Controle (CN); Trombose venosa profunda (TVP); Interleucina (IL); Fator de necrose tumoral- α (TNF- α); Fator de crescimento derivado de plaqueta (PDGF); e CD40 ligante solúvel (sCD40L).

Em relação à avaliação do sobrenadante do teste de proliferação na condição meio basal e SFB 10% (correspondente à figura 20), observamos um aumento das interleucinas pró-inflamatórias, significativo para IL-6 do grupo TVP, figura 26.

Os analitos P-selectina, IL-1 β e sVEGFR2 não foram detectados no sobrenadante celular.

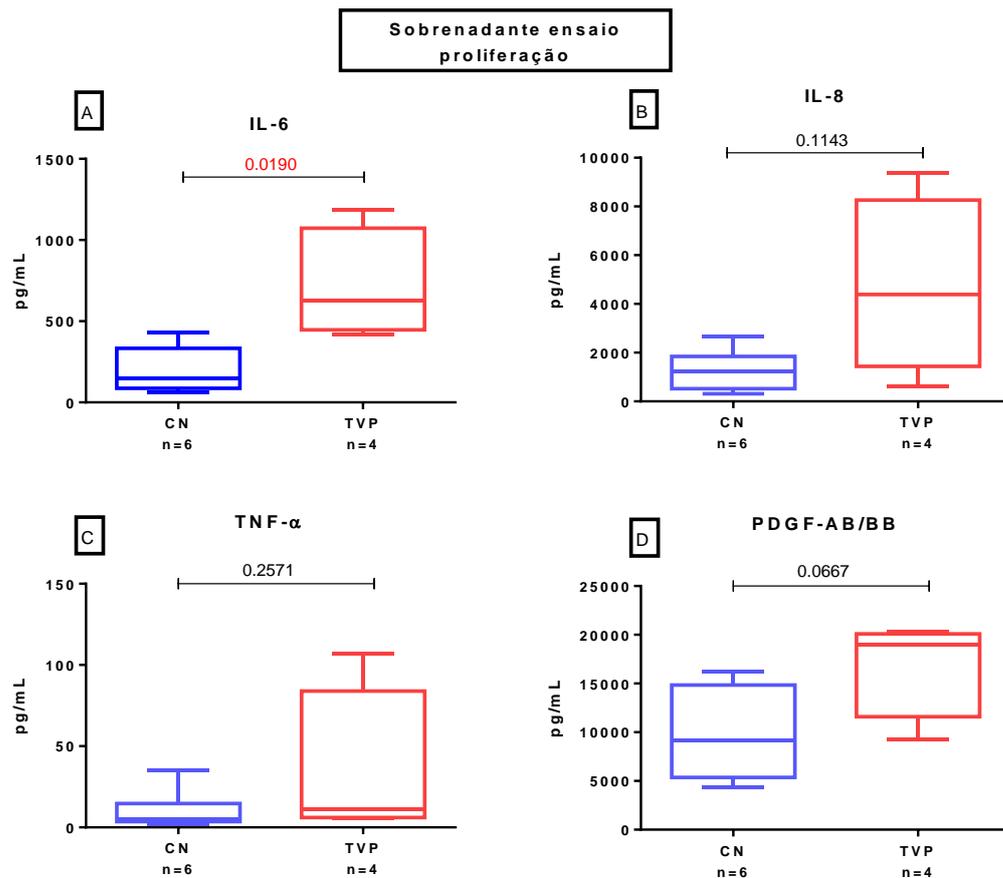


Figura 26. Mensuração de mediadores solúveis no sobrenadante do ensaio de proliferação. Expressão significativamente elevada da IL-6 no grupo de TVP aguda vs CN, Teste Mann Whitney. **Abreviações:** Controle (CN); Trombose venosa profunda (TVP); Interleucina (IL); Fator de necrose tumoral- α (TNF- α); Fator de crescimento derivado de plaqueta (PDGF).

Quanto as outras moléculas de adesão, sICAM-1 e sVCAM-1, observamos uma diminuição não significativa no grupo TVP em relação ao CN de 19.486 pg/mL para 65.484 pg/mL no sICAM-1 e de 7339 vs. 70173 pg/mL para VCAM-1, respectivamente.

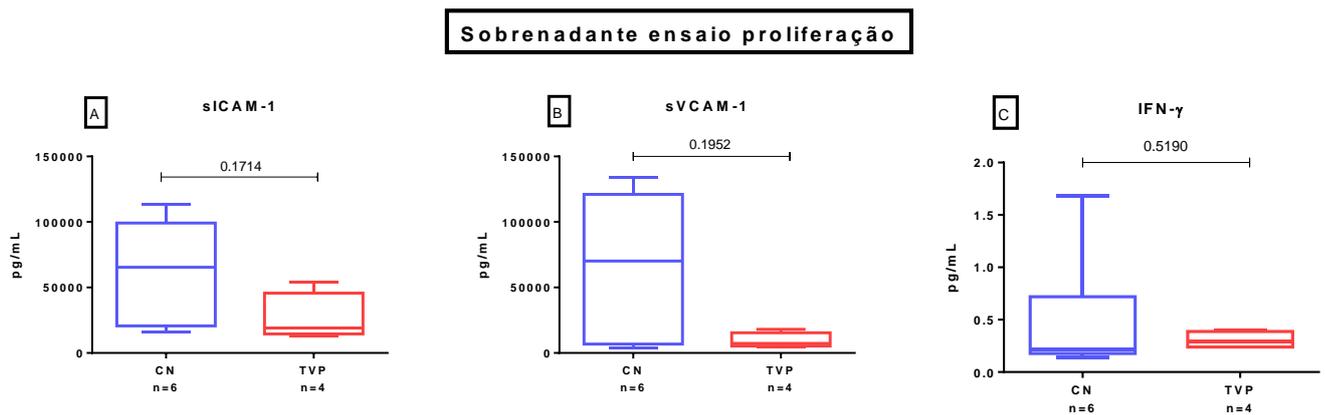


Figura 27. Mensuração de mediadores solúveis no sobrenadante do ensaio de proliferação. Expressão significativamente elevada da IL-6 no grupo de TVP aguda vs CN, Teste Mann Whitney. **Abreviações:** Controle (CN); Trombose venosa profunda (TVP); Interferon gamma (IFN- γ); Molécula de adesão intercelular solúvel 1 (sICAM-1) e Molécula de adesão vascular solúvel 1 (sVCAM-1).

Análise seguimento grupo 2: TVP aguda e TVP >6meses

O isolamento das CEFCs nos pacientes com TVP >6 meses somente teve sucesso em 5/20 pacientes (25% de sucesso). Contudo, como esse grupo não tem CEFCs isoladas na fase aguda, não foi possível realizar análises prospectivas em relação a esse quesito.

No geral, o grupo apresentou uma média de 39 ± 8 anos, IMC 28 (26.8 – 30.4) kg/m² e o sexo masculino (3:2). Os fatores de risco relacionados a trombose na fase aguda foram: cirurgia com anestesia por mais de 30 minutos (n=2); admissão no hospital menor de 3 dias (n=1) e uso de anticoncepcional (n=2). E no atual momento da segunda coleta apenas 1 de 5 pacientes ainda fazia uso do anticoagulante.

Essas células foram caracterizadas propriamente com a imunofenotipagem por citometria de fluxo e avaliadas parcialmente quanto aos testes de função endotelial e TGT, faltando a conclusão das análises de 2 pacientes.

4.3. SUBANÁLISE – SUCESSO OBTENÇÃO DAS CEFCs

Como obtivemos um baixo sucesso no isolamento das CEFCs, este trabalho realizou uma subanálise relacionada aos possíveis mediadores plasmáticos e celulares envolvidos naqueles em que permaneceram apenas MNCs, ou os que obtiveram sucesso na obtenção das CEFCs.

Análises plasmáticas e de sobrenadante celular

Dentre os analitos mencionados anteriormente, os únicos que apresentaram diferenças consideráveis entre as medianas “sucessos CEFCs” e “apenas MNCs” foram as moléculas de adesão. Observamos a presença significativa dos mediadores solúveis ICAM-1 e VCAM-1 no plasma do grupo sucesso CEFCs, figuras 28 A e B. E, estratificando esses achados em subgrupos de CN e TVP aguda, continuamos verificando a presença de sICAM-1 e sVCAM-1 aumentados no grupo em que obtivemos sucesso com as CEFCs.

Em confirmação, essas moléculas de adesão também estavam aumentadas no sobrenadante das CEFCs em relação a apenas MNCs (figuras 28 C e D). Mesmo quando segregamos CN e TVP aguda, para verificar se havia diferença nas medianas, isto não pode ser demonstrado. Além disso, alguns analitos não foram detectados nos sobrenadantes tais como sVEGFR2, sCD40L, IL-1 β e P-selectina.

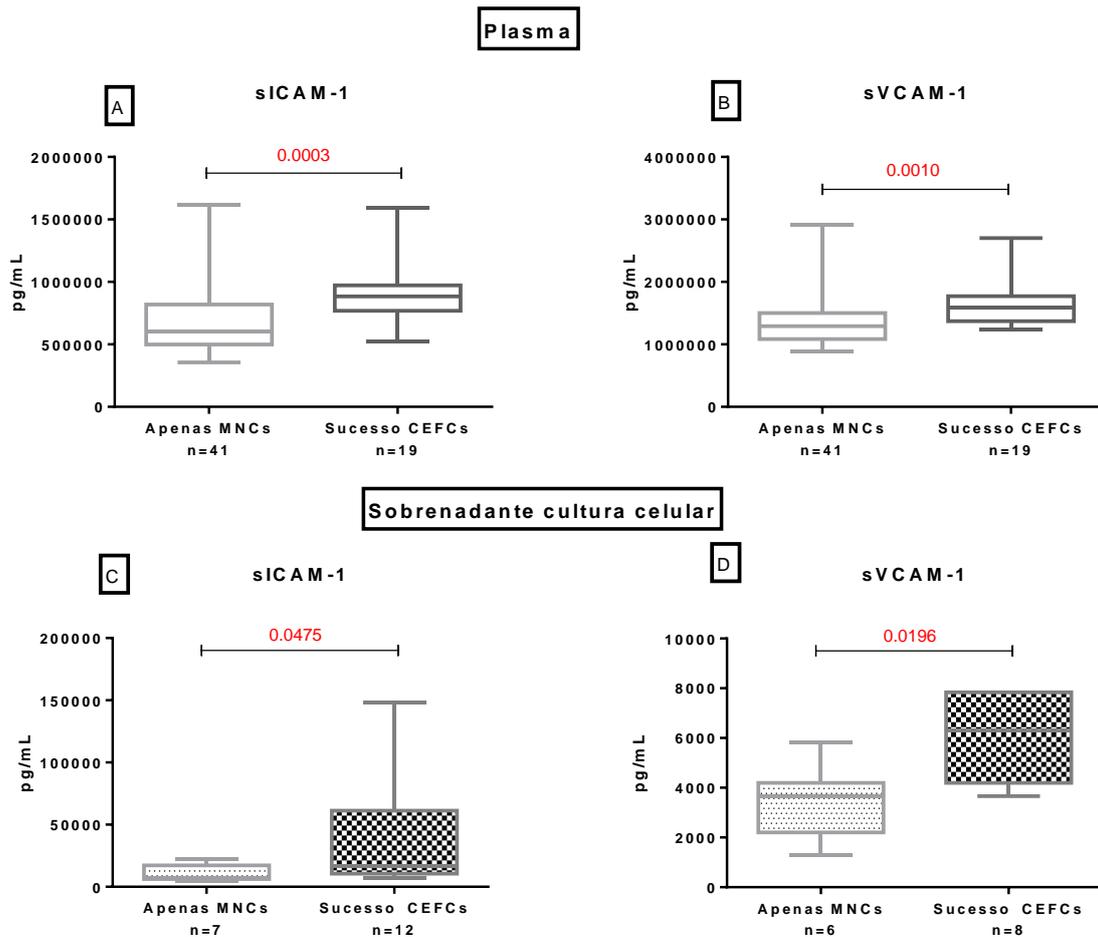


Figura 28. Níveis de moléculas de adesão solúveis no plasma e sobrenadante cultura sem e com sucesso na obtenção de CEFCs. Aumento significativo das moléculas sICAM-1 e sVCAM-1 no grupo que isolou as CEFCs. Teste Mann whitney. **Abreviações:** Molécula de adesão intercelular solúvel 1 (sICAM-1); Molécula de adesão vascular solúvel 1 (sVCAM-1); Células mononucleares (MNCs) e Células endoteliais formadoras de colônias (CEFCs).

Quantificação das CECs

Em relação ao número de CECs circulantes, observamos um aumento de frequência celular entre sucesso CEFCs com uma mediana de 4.0 (IIQ 2.6-4.4) / μ L e apenas MNCs com 2.8 (IIQ 1.1-4.3) / μ L, porém não significativo conforme representado na figura a seguir.

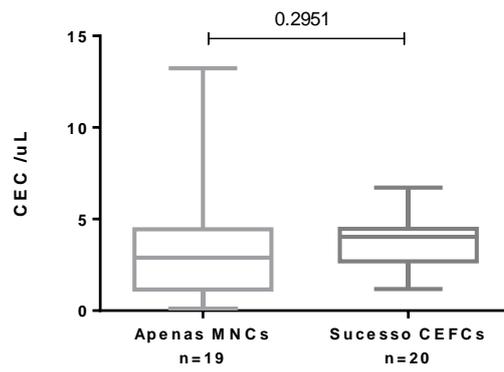


Figura 29. Frequência de CECs nos grupos com apenas MNCs e sucesso CEFCs. Contagem de células similar entre ambos os grupos, Teste Mann whitney. **Abreviações:** Célula endotelial circulante (CEC); Células mononucleares (MNCs) e Células endoteliais formadoras de colônias (CEFCs).

4.4. Resumo dos achados

Por fim, na tentativa de organizar os principais achados deste grupo organizamos um resumo no formato de esquemas. O primeiro foi relacionado as investigações dos grupos 1 e 2 (figura 30), e embora alguns dos resultados apresentados abaixo não tenham diferenças estatisticamente significativas, acreditamos que são dados importantes nas observações e discussões deste trabalho.

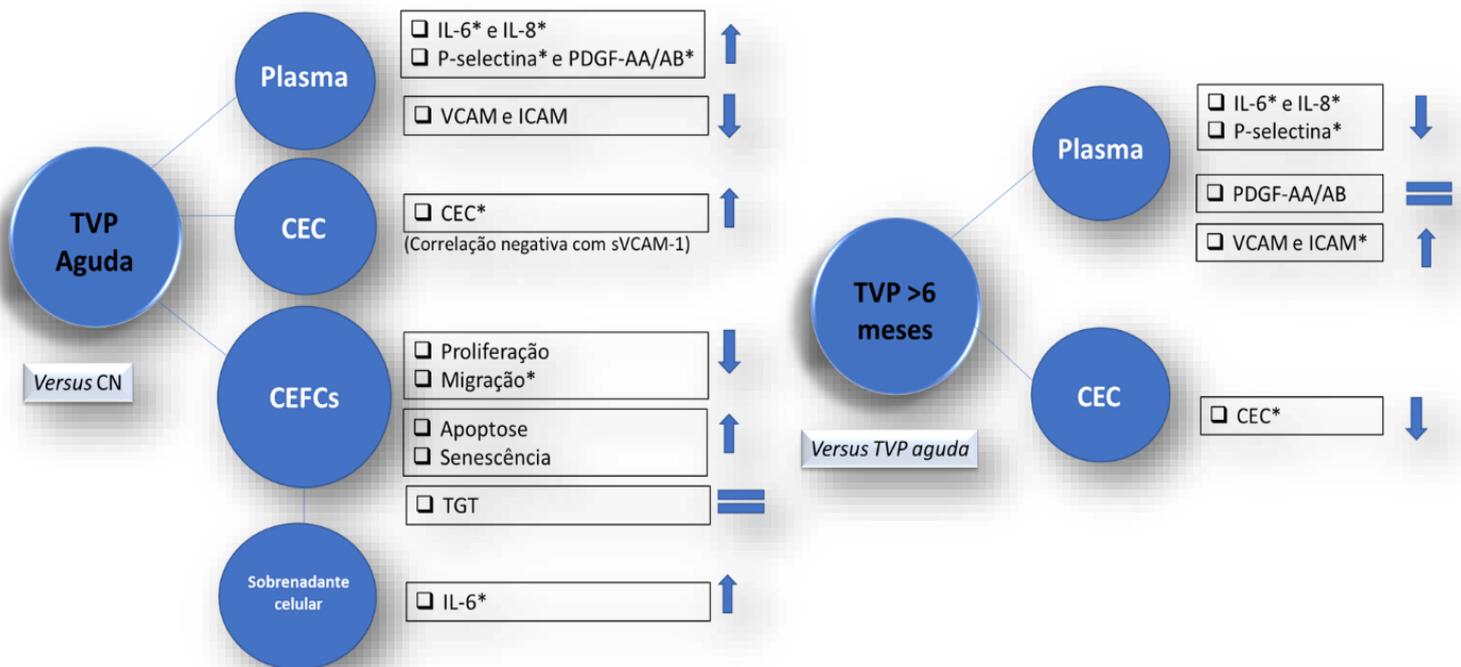


Figura 30. Fluxograma dos principais achados no grupo 1 e 2. As alterações representadas no esquema referem-se ao grupo TVP aguda do lado esquerdo e TVP >6 meses ao lado direito, sendo que diferenças significativas foram representadas por asterisco. **Abreviações:** Célula endotelial circulante (CEC), Células endoteliais formadoras de colônias (CEFCs); Controle (CN), Trombose venosa profunda (TVP); Interleucina (IL); Molécula de adesão intercelular solúvel 1 (sICAM-1); Molécula de adesão vascular solúvel 1 (sVCAM-1); Fator de crescimento derivado de plaqueta (PDGF) e Teste de geração de trombina (TGT).

Em relação aos achados da subanálise, descrevemos os principais achados na figura 31.

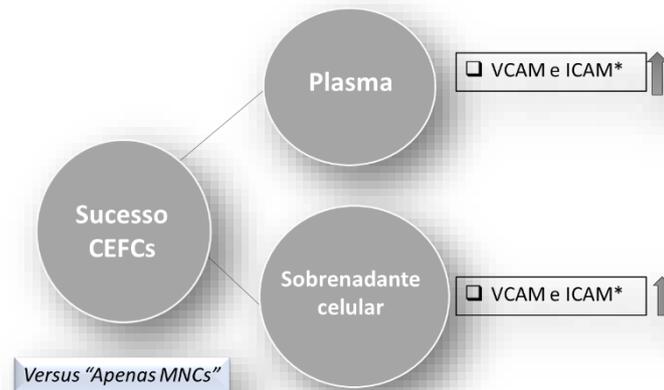


Figura 31. Fluxograma dos principais achados na subanálise: Apenas MNCs vs Sucesso CEFCs. Aumento significativo das moléculas de adesão no plasma e sobrenadante das células que obtiveram sucesso no isolamento das CEFCs. **Abreviações:** Molécula de adesão vascular solúvel 1 (sVCAM-1); Molécula de adesão intercelular solúvel 1 (sICAM-1); Células endoteliais formadoras de colônias (CEFCs); e Células mononucleares (MNCs).

5. DISCUSSÃO

A TVP é uma doença em que alterações dos componentes do sangue, do fluxo sanguíneo ou do endotélio podem desencadear o processo trombótico (1,2). Quaisquer que sejam as principais causas da TVP, ela é responsável por até 90% de todas as embolias pulmonares e como nem sempre a TVP é clinicamente diagnosticada, há um considerável número de óbitos associados ao TEV (73). Além das possíveis complicações na fase aguda, os pacientes podem apresentar a longo prazo a SPT e recorrência, gerando um grande impacto sobre a qualidade de vida e sobre os custos da assistência médica. Portanto, a TVP é um importante problema de saúde pública, e pesquisas que visem a identificação de marcadores ou mecanismos fisiopatológicos, auxiliando no diagnóstico e tratamento são muito importantes na prática clínica.

Apesar do envolvimento do endotélio no processo trombótico venoso, a impossibilidade de uma análise direta do mesmo, dificulta a compreensão do seu real papel na doença. E, estudos que avaliem a função das células endoteliais provenientes de pacientes com TVP na fase aguda são interessantes.

Grupo 1 – Análise coorte TVP aguda vs. CN

Devido aos critérios estritos de inclusão e exclusão dos pacientes com TVP aguda, houve muita dificuldade na seleção de pacientes, constituindo um grupo restrito, permitindo análises mais exploratórias, e sem impacto epidemiológico.

Em geral, captamos 25 pacientes sendo predominante o sexo feminino (n=16) com a idade média de 45 anos e IMC de 29 Kg/M². Esses dados vão de acordo com a literatura, em que mulheres apresentam proporção similar na incidência de TVP até os 44 anos, devido aos fatores de risco na idade fértil, e após isso, a incidência se torna significativamente maior nos homens (2).

Além disso, conforme esperado, a trombose provocada foi a mais comum, sendo que 64 % dos casos apresentavam algum fator de risco, como o uso de anticoncepcional (50 %), cirurgia com anestesia acima de 30 minutos com imobilização (25 %), e trauma (13 %). E 24 pacientes estavam sob terapia anticoagulante na hora da coleta de sangue.

Em relação aos parâmetros hematológicos, observamos contagem mais elevada de glóbulos brancos nos pacientes com TVP em relação ao CN, e embora não estatisticamente significativo, mostra uma tendência em conformidade com o descrito em outros estudos, um aumento dos leucócitos e plaquetas na fase aguda.

Os níveis de interleucinas pró-inflamatórias encontrados no grupo TVP foram de acordo com a literatura, em que especialmente a IL-6 encontra-se aumentada (74,75). A presença desta interleucina é muito adequada para defesa do hospedeiro, no entanto a alteração dos níveis e expressão de IL-6 contribui para o aparecimento e manutenção de doenças inflamatórias (76). E, no contexto na TVP na fase aguda, o aumento deste marcador é descrito (75,77).

Também observamos um aumento do PDGF-AA/AB nos pacientes com TVP quando comparado ao CN, e embora não existam estudos descrevendo mensurações deste fator de crescimento na fase aguda, a sua síntese é aumentada pelas plaquetas e células endoteliais, como resposta a estímulos externos tal como hipóxia e trombina (78–81).

Outro componente que tem sido descrito como um marcador pertinente na TVP é a P-selectina, localizado nas membranas dos α -grânulos plaquetários e nos corpúsculos de *Weibel-Palade* de células endoteliais. Esta molécula de adesão se encontra aumentada na forma solúvel na TVP, e sua principal função está associada ao processo de adesão de leucócitos a plaquetas ativadas incorporadas a um trombo em crescimento, apoiando o recrutamento de leucócitos circulantes (82,83). Diversos estudos demonstraram aumento dos níveis de P-selectina nos pacientes com TVP aguda, e nossos resultados corroboram esses achados (84,85).

Curiosamente, não encontramos valores aumentados das outras moléculas de adesão (sICAM-1 e sVCAM-1) conforme descrito por Mosevoll K et al., por exemplo (30). Uma justificativa para isso deve-se ao fato de que a coorte empregada em seu estudo incluía pacientes com câncer e doenças inflamatórias/infecciosas em fase ativa, e estas moléculas estão aumentadas para a promoção do crescimento do tumor e metástases, por exemplo (86). No mais, a maioria dos estudos que demonstram o aumento de sICAM-1 e sVCAM-1 em pacientes com TVP não corresponde aos primeiros 30 dias após o diagnóstico, como é o caso do nosso projeto.

Nas avaliações de CECs, nossos resultados foram similares com o estudo anterior de nosso grupo, o qual mostrou um aumento de frequência celular nos pacientes com TVP em fase aguda quando comparado ao grupo controle. Esse trabalho precedeu outra publicação de proposta de padronização para definição das CECs (87), do qual adotamos a metodologia.

O número elevado de CECs estaria associado à lesão endotelial, o que provocaria o desprendimento das células do vaso sanguíneo. Neste caso, poderiam ser detectadas CECs integras, em processo de apoptose ou necróticas, e liberação de micropartículas das mesmas (88). Embora não existam outros estudos avaliando as CECs na TVP, pode-se observar um aumento em outras doenças tais como na hipertensão arterial, nas coronariopatias, nas infecções, no choque séptico, entre outros (89–92), podendo ser consideradas como biomarcadores para diagnóstico e tratamento. Além da discussão sobre a origem celular, se mielóide ou endotelial, mais estudos são necessários para se estabelecer as CECs como um biomarcador na TVP.

Ainda sobre as CECs, verificamos um resultado interessante quanto a uma correlação negativa com o sVCAM-1. Observamos maior número de CECs vs. menor nível de sVCAM-1 no grupo TVP, e uma vez que esta molécula de adesão parece representar um marcador importante para o isolamento das CECs, discutiremos esse achado em detalhes a seguir.

Grupo 2 – Função endotelial

Em relação aos pacientes que obtivemos sucesso no isolamento das CECs, que na verdade configura a coorte de interesse nesse estudo, os fatores sexo, idade, IMC e hemograma não variaram estatisticamente em relação ao grupo controle. É interessante ressaltar que esses pacientes tiveram trombose não provocada ou desencadeada por fator de risco transitório menor (uso de anticoncepcional). Portanto, próximo a data de coleta, os pacientes não estiveram expostos a fatores de risco que por si só já poderiam ter influenciado no aumento ou função dessas células.

Além disso, quando avaliamos as interleucinas no plasma dos CN vs. TVP, observamos não haver diferenças significativas, mas foi mantido um padrão similar daquele demonstrado no grupo TVP inicial (grupo 1), em que IL-6, IL-8 e PDGF-AA/AB

estavam aumentadas. Talvez o baixo número de casos deste grupo possa explicar a falta de significância.

Na caracterização das CEFCs, observou-se uma morfologia clássica endotelial, de acordo com critérios fenotípicos descritos na literatura: positividade para os marcadores endoteliais tais como CD31, CD144, CD146, e CD309 e negatividade ou baixa expressão para CD14 (monócitos), CD45 (leucócitos), CD 34 e CD133 (célula progenitora endotelial) (67,93–95). Embora não exista um marcador específico para as CEFCs, este painel permite a seleção das CEFCs de natureza endotelial e não hematopoiética (MACs – célula mieloide angiogênicas). Assim, utilizando esse padrão de análise, não observamos diferenças estatísticas na expressão dos marcadores mencionados quando comparamos os grupos TVP e CN.

Quanto aos testes de função endotelial, visto que esta é a primeira vez em que se avalia CEFCs na TVP na fase aguda, e com uma metodologia avançada, não dispomos de outros dados na literatura para comparações. A utilização sistema óptico de análise em tempo real Incucyte® permite um avanço metodológico importante, visto que as abordagens convencionais para a análise de células capturam apenas um único ponto em um determinado tempo, permitindo apenas medições de ponto único e de ponto final, e as células são perturbadas ou destruídas como parte do processo de ensaio. O sistema Incucyte® oferece a vantagem de realizar análises de células vivas, e realiza análise das imagens de forma automática e contínua ao longo de um experimento, enquanto as células permanecem inalteradas em um ambiente fisiológico.

Os dados do ensaio de proliferação demonstraram níveis menores de proliferação nas CEFCs da TVP aguda, embora que ambos os grupos tiveram um crescimento celular significativo a partir do tempo zero.

Uma possível explicação para diminuição da proliferação no grupo TVP é a presença significativa da IL-6 encontrada no sobrenadante celular, que além de desempenhar um papel crucial na defesa do hospedeiro contra infecções e lesões teciduais, em situações de inflamação sistêmica aguda, pode provocar lesão endotelial vascular por meio da desmontagem da VE-caderina e aumento da expressão do receptor C5a, que pode ocasionar aumento da permeabilidade vascular (96,97). Além disso, nossos achados sugerem um efeito deletério da IL-6 (também

encontrada aumentada no plasma de pacientes com TVP) sobre células de indivíduos saudáveis no ensaio de proliferação, uma vez que se observou a redução da capacidade proliferativa significativamente nas primeiras 18 horas.

Quanto ao ensaio de migração celular, as CEFCs dos pacientes com TVP apresentaram uma resposta mais lenta ao reparo tecidual nas primeiras horas após o “teste de arranhão”, embora ambos os grupos atingiram 100% de confluência ao final do experimento. Esses dados são relevantes quanto aos achados de função regenerativa das CEFCs, uma vez que o uso terapêutico dessas células tem demonstrado eficácia ao promover o reparo vascular em tecidos isquêmicos, incluindo o miocárdio (98), cérebro (99), membro posterior (100) e rim (101). Estes dados podem sugerir que as CEFCs da TVP têm uma resposta de reparo celular lenta, que talvez interfira com a capacidade de regeneração vascular logo após o episódio trombótico.

Em relação a apoptose, observamos um maior número de morte celular no grupo TVP aguda em relação ao CN nas duas condições avaliadas: meio + SFB 10% e meio + TNF- α . Esses dados vão de acordo com o estudo de Hernandez-Lopez R et al., o qual também verificou um aumento da apoptose em pacientes com TVP. Ainda neste estudo, foi correlacionada a morte celular com os elevados níveis de ROS e do DNA danificado através da expressão da histona fosforilada associada H2AX (γ H2AX) (68).

Quanto aos testes de senescência, um importante campo de observação funcional das CEFCs, observamos uma maior quantidade de células positivas para coloração de β -galactosidase (SA- β -Gal) nos lisossomas celulares, uma técnica comumente empregada (102). Porém, para confirmação de tais achados, acreditamos que seriam necessárias análises mais específicas e a adição de um controle positivo para possíveis conclusões (103–105).

Ainda, as propriedades funcionais em pacientes com TVP devem ser consideradas, como por exemplo, a relação entre TVP e encurtamento dos telômeros, um marcador de envelhecimento biológico e preditor de senescência replicativa (106), o que impacta na capacidade proliferativa e na função endotelial (107). Este dado já foi demonstrado em outras doenças vasculares, como o sucesso da cultura em apenas 15% de indivíduos com diabetes (108).

Dos 25 pacientes coletados, observamos o surgimento de colônias em 13 indivíduos, porém não conseguimos isolá-las com sucesso em 8 pacientes, restando um número amostral de 5 células, sendo que 1 clone apresentou alteração de morfologia. Essa demora de expansão celular nos levou a crer que as células poderiam ser senescentes, no entanto, uma limitação do estudo foi que não conseguimos avaliar essas células que perdemos, nos restando apenas as que foram isoladas.

Por fim, quanto ao TGT, observamos que a presença CEFCs altera os parâmetros da geração de trombina quando comparado apenas com plasma de referência sem interferência celular. Esses dados vão de acordo com Catieau B et al., em que as células endoteliais possuem um papel anticoagulante conforme valores prolongados de *Lagtime*, e pico e ETP diminuídos na presença das CEFCs (109). Um dado esperado em relação ao endotélio, visto seu papel antitrombótico, anticoagulante e pró-fibrinolítico na maior parte das situações fisiológicas. Contudo, quando comparamos a capacidade de geração de trombina entre CN e TVP não observamos diferenças nesse potencial entre os grupos.

Esses achados são no mínimo interessantes visto que esperávamos que com uma possível disfunção endotelial o fenótipo anticoagulante e pró fibrinolítico do endotélio fosse alterado para pró-trombótico (110–112).

O que podemos especular é que a ativação das células endoteliais e atuação na coagulação vai depender de ativação, como por exemplo o estímulo pelo TNF- α ou IL-6 ou outras interações celulares (neutrófilos). Através de estímulos inflamatórios sobre os neutrófilos e a liberação de armadilhas extracelulares de neutrófilos (NETs) ocorre a liberação de histonas na circulação, podendo ser tóxicas e comprometendo a função anticoagulante das células endoteliais. Kim et al., demonstrou que células endoteliais tratadas com histona reduziram o intervalo Lag e aumentaram ETP em um plasma normal, e estratégias para inibir os efeitos nocivos das histonas nas células endoteliais poderiam ser necessários para evitar um ambiente trombótico (113).

Ainda, podemos afirmar que o TGT é um teste robusto, muito utilizado na literatura e que vem sendo empregado como forma de observar as células endoteliais na coagulação (109,114,115). Devido essa adaptação, este TGT gera algumas variações metodológicas, e para esse estudo nos preocupamos em fazer uma

padronização prévia quanto ao tipo de placa a ser utilizada, densidade celular, entre outros. Porém, acreditamos que outros testes deveriam ser formulados para o entendimento das CEFCs na geração de trombina, como é o caso de utilizar uma ativação prévia com o plasma dos pacientes (sem anticoagulação), e inibindo ou dosando alguns dos componentes envolvidos na coagulação e endotélio (por exemplo trombosmodulina, receptor da proteína C).

Subanálises sucesso das CEFCs

Ao observarmos maior número de CECs nos pacientes com TVP aguda, esperávamos que estes achados fossem concomitantes nas CEFCs, e como resultado encontramos o oposto - baixo sucesso na obtenção dessas células. No mais, o baixo sucesso no cultivo celular dos pacientes com TVP nos levou a realizar análises adicionais para observação e possível entendimento de mecanismos e moléculas envolvidas no sucesso da obtenção das CEFCs.

Além das células circulantes, observamos algumas possíveis interleucinas e moléculas de adesão que poderiam apresentar papel chave na obtenção das CEFCs, sendo destaque sICAM-1 e sVCAM-1, aumentadas no plasma de pacientes e controles que tiveram sucesso no cultivo celular. Além disso, o sobrenadante com CEFCs também produziram maior quantidade dessas moléculas de adesão quando comparado ao daquele das células que não surgiram. Esse aumento no grupo isolado pode ser esperado, visto que são marcadores mais expressos em células endoteliais (116).

Quando estratificamos o sucesso na cultura de CEFCs entre CN e pacientes, não observamos diferenças entre os analitos. No entanto, algo que parece ser importante na cultura é o tempo de surgimento das colônias, uma vez que na TVP estas surgiam tardiamente (28^o dia), e notamos que ao passar do tempo as células mudavam sua morfologia, perdiam capacidade proliferativa (possivelmente relacionado à senescência ao qual vamos discutir a seguir), e apresentavam uma imunofenotipagem alterada quanto os marcadores endoteliais.

Uma possível explicação para o não sucesso no isolamento de CEFCs em pacientes com TVP pode ser o fato deste grupo apresentar menores níveis circulantes

de moléculas de adesão. Como exposto anteriormente, o aumento destas proteínas pode estar associado a obtenção das CEFCs. Essa observação é original, porém especulativa e necessitaria de um maior grupo amostral com investigações mais aprofundada sobre vias e interações dessas moléculas.

No mais, acreditamos que questões metodológicas também podem afetar o sucesso da obtenção das CEFCs. É importante destacar que a fonte de obtenção dessas células é de grande importância, sendo que o sangue do cordão umbilical rende números maiores de colônias ECFC do que o sangue adulto, o que requer maior volume de amostra (54). Além disso, como apresentado no *guideline* em 2019 no ISTH, outros aspectos são relevantes no isolamento das CEFCs tais com o tipo de matriz extracelular utilizado e número de passagens (117). No entanto, mesmo seguindo protocolos previamente publicados e o guia para padronização das CEFCs, o estabelecimento da cultura é complexo, de longa duração, mesmo para os indivíduos saudáveis, como no estudo de Boer S et al., (2020), em que houve um sucesso menor que 50 % (63).

Além dos fatores mencionados acima, acreditamos que as questões fisiológicas de cada doença investigada irão impactar na obtenção ou não das CEFCs. Como por exemplo, em estudos com pacientes com anemia falciforme o sucesso pode chegar a até 60% (71), e 70% em pacientes com doença pulmonar obstrutiva crônica (118).

Na TVP, podemos citar apenas 1 estudo, que não reporta a taxa de sucesso de obtenção das CEFCs, com 21 pacientes com TVP com mais de 3 eventos trombóticos os quais poderiam estar correlacionados com um aumento na obtenção das CEFCs devido à tentativa de reparo constante da lesão endotelial. Entretanto, este estudo não foi criterioso quanto a seleção dos pacientes, incluindo pacientes fumantes, um conhecido fator de impacto para o aumento de CEFCs (67).

Follow-up pacientes TVP >6 meses

Em relação aos pacientes com TVP crônica, conseguimos realizar a segunda coleta em 20 indivíduos, e nenhum deles havia apresentado um novo episódio de trombose.

Laboratorialmente, observamos uma alteração do quadro inflamatório quanto à diminuição dos leucócitos e também das interleucinas plasmáticas IL-6, IL-8 e da P-selectina. Essa inversão nivelou com os valores do CN, o que poderíamos considerar que os pacientes poderiam ter voltado ao seu *baseline*. No entanto, sVCAM-1 e sICAM-1 aumentaram significativamente pós 6 meses, sendo que o VCAM-1 apresentou níveis aumentados quando comparado ao CN.

As alterações dessas moléculas de adesão são descritas em estudos com TVP crônica, nos quais o aumento dessas moléculas estaria relacionado com o aumento do risco de SPT (119,120). Esses achados foram observados em outros dois estudos do nosso grupo, o primeiro em que pacientes com SPT grave apresentaram níveis plasmáticos elevados de proteína C reativa, sICAM-1, sE-selectina quando comparados a pacientes com SPT leve/ausente (8). No segundo trabalho, além de níveis elevados de sVCAM-1 e sICAM-1, demonstrou-se uma alteração de ativação de neutrófilos, colaborando para uma subsequente ativação e lesão do endotélio ativado e um possível ciclo vicioso de ativação entre neutrófilos e endotélio, podendo levar à trombose (121). No entanto, a coorte de ambos os grupos foi avaliada com pacientes com mais de 2 anos da fase aguda, e é possível que o aumento das moléculas de adesão ocorra com o passar no tempo.

Também observamos uma diminuição das CECs pós fase aguda, e esses achados foram de acordo com a correlação negativa entre sVCAM-1, que se encontra aumentada. No entanto, em relação as avaliações de função endotelial, necessitamos realizar análises finais *in vitro* para conclusão da atividade endotelial na fase crônica. Infelizmente, não conseguimos a realização de análise prospectiva, visto que não foram isoladas as CEFCs dos mesmos indivíduos da fase aguda.

Considerações finais

Este trabalho de doutorado nos permitiu avançar quanto aos conhecimentos das células endoteliais, tanto em pacientes com TVP aguda como em controles normais. Foi um trabalho que apresentou alguns desafios quanto a estabelecer: (1) a coorte de pacientes com trombose ao diagnóstico; (2) implantação da sala de cultura do laboratório de Hemostasia, (3) obtenção das CEFCs; e (4) padronização do uso do equipamento Incucyte®. Além disso, o cronograma de execução deste projeto foi

impactado devido a pandemia COVID-19, principalmente quanto à suspensão de atividade presencias e perda dos pacientes com TVP na fase aguda.

A dificuldade na obtenção das CEFCs foi um problema real, e nesse sentido aumentamos esforços quanto a utilização de metodologias padronizadas de acordo com a literatura, aumento do volume de sangue coletado, e discussões científicas com pesquisadores colaboradores para certificação que estávamos conduzindo um bom desenho experimental. E, portanto, o estudo propôs a adição de uma terceira avaliação quanto ao sucesso ou não na obtenção das CEFCs, na tentativa de verificar mecanismos envolvidos, possivelmente fisiológicos.

É possível, que se nossos critérios de seleção da coorte não fossem tão restritivos, teríamos conseguido maior sucesso na obtenção das CEFCs, no entanto, estaríamos acrescentando outros vieses que dificultariam a real observação da TVP e células endoteliais. Estudamos as CEFCs de pacientes sem os fatores de risco que poderiam impactar diretamente na função endotelial, como por exemplo cirurgias e infecções.

Ainda assim, mesmo com um número amostral pequeno de células, nosso estudo tem um número semelhante à de outros já publicados, como na anemia falciforme (93) e fibrose pulmonar idiopática (115). Podemos afirmar que nossos dados são preliminares quanto à observação de células endoteliais disfuncionais em pacientes com TVP na fase aguda, e com a conclusão das análises endoteliais de fase crônica poderemos investigar a atividade destas células a longo prazo.

Como uma limitação do estudo, podemos ressaltar a não utilização de CEFCs na primeira passagem. Isto é, como trabalhamos com células da 4^a até a 6^a passagem é possível que as CEFCs tenham tido um tempo para remodelamento celular através das passagens, e perdemos a oportunidade de analisar o comportamento destas células a fresco. Para próximas investigações, seria interessante o aumento do número amostral e verificar se avaliação em passagens mais precoces influenciaria na função das CEFCs.

6. CONCLUSÃO

Nossos dados evidenciaram que é possível estabelecer a cultura de CEFCs de pacientes com TVP na fase aguda, com características próprias de célula endotelial – ainda que com grande dificuldade no seu isolamento.

A própria doença pode estar relacionada ao baixo sucesso na obtenção de CEFCs, uma vez que as CEFCs de pacientes apresentam alterações de função celular com a diminuição na capacidade de proliferação e reparo celular. Ainda, observamos um aumento de expressão de IL-6 nas CEFCs dos pacientes o que pode levar à disfunção endotelial.

No mais, células saudáveis sob estímulos com plasma de pacientes com TVP aguda apresentam alterações na proliferação celular, demonstrando também haver uma influência extracelular.

Quanto alterações para estado pró-coagulante em células endoteliais, não observamos haver diferenças entre ambos os grupos quanto à geração de trombina, apresentando inclusive um fenótipo anticoagulante.

Nossos achados são originais e abrem caminhos para outras possíveis investigações, quanto ao envolvimento de ICAM-1 e VCAM-1; da interação plasmática sobre as CEFCs; e no envolvimento de outros grupos celulares quanto a suas propriedades na coagulação.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Wolberg AS, Rosendaal FR, Weitz JI, Jaffer IH, Agnelli G, Baglin T, et al. Venous thrombosis. *Nat Rev Dis Prim.* 2015;1.
2. Heit JA. Epidemiology of venous thromboembolism. Vol. 12, *Nature Reviews Cardiology.* 2015.
3. da Silva LQ, Cancela RBB, de Lima Montalvão SA, Huber SC, Vieira-Damiani G, Triglia RM, et al. The effect of lyophilized platelet rich-plasma on skin aging: a non-randomized, controlled, pilot trial. *Arch Dermatol Res.* 2021;
4. Raskob G, Angchaisuksiri P, Blanco AN, Buller H, Gallus A, Hunt BJ, et al. Thrombosis: A major contributor to global disease burden. *Thromb Haemost.* 2014;112(5).
5. Beckman MG, Hooper WC, Critchley SE, Ortel TL. Venous Thromboembolism. A Public Health Concern. *American Journal of Preventive Medicine.* 2010.
6. Næss IA, Christiansen SC, Romundstad P, Cannegieter SC, Rosendaal FR, Hammerstrøm J. Incidence and mortality of venous thrombosis: A population-based study. *J Thromb Haemost.* 2007;5(4).
7. Murray CJL, Ezzati M, Flaxman AD, Lim S, Lozano R, Michaud C, et al. GBD 2010: Design, definitions, and metrics. Vol. 380, *The Lancet.* 2012.
8. Bittar LF, da Silva LQ, de Andrade Orsi FL, Zapponi KCS, de Moraes Mazetto B, de Paula EV, et al. Increased inflammation and endothelial markers in patients with late severe postthrombotic syndrome. *PLoS One.* 2020;
9. Mackman N. Triggers, targets and treatments for thrombosis. Vol. 451, *Nature.* 2008.
10. Darze ES, Casqueiro JB, Ciuffo LA, Santos JM, Magalhães IR, Latado AL. Pulmonary embolism mortality in Brazil from 1989 to 2010: Gender and regional disparities. *Arq Bras Cardiol.* 2016;106(1).
11. Raymundo SR de O, Lobo SMA, Hussain KMK, Hussein KG, Secches IT. O que mudou nas últimas décadas na profilaxia do tromboembolismo venoso em pacientes internados: artigo de revisão. *J Vasc Bras.* 2019;18.
12. Kahn SR, Comerota AJ, Cushman M, Evans NS, Ginsberg JS, Goldenberg NA, et al. The postthrombotic syndrome: Evidence-based prevention, diagnosis, and treatment strategies: A scientific statement from the American heart association. *Circulation.* 2014;130(18):1636–61.
13. Poort SR, Rosendaal FR, Reitsma PH, Bertina RM. A common genetic variation in the 3'-untranslated region of the prothrombin gene is associated with elevated plasma prothrombin levels and an increase in venous thrombosis. *Blood.* 1996;
14. Rosendaal FR, Koster T, Vandenbroucke JP, Reitsma PH. High risk of thrombosis in patients homozygous for factor V Leiden (activated protein C resistance). *Blood.* 1995;
15. Heijboer H, Brandjes DPM, Büller HR, Sturk A, ten Cate JW. Deficiencies of Coagulation-Inhibiting and Fibrinolytic Proteins in Outpatients with Deep-Vein Thrombosis. *N Engl J Med.* 1990;323(22).
16. Virchow R. *Gesammelte Abhandlungen zur Wissenschaftlichen Medizin.* Frankfurt am Main Meidinger U Comp. 1856;
17. Bagot CN, Arya R. Virchow and his triad: A question of attribution. Vol. 143, *British Journal of Haematology.* 2008.
18. Martinelli I, De Stefano V, Mannucci PM. Inherited risk factors for venous thromboembolism. Vol. 11, *Nature Reviews Cardiology.* 2014.
19. Ogston D, Douglas AS. Deep venous thrombosis of the legs after strokes. Part

- I—incidence and predisposing factors. *Br Med J.* 1976;1(6019).
20. Kearon C, Ageno W, Cannegieter SC, Cosmi B, Geersing GJ, Kyrle PA. Categorization of patients as having provoked or unprovoked venous thromboembolism: guidance from the SSC of ISTH. *J Thromb Haemost.* 2016;14(7).
 21. Anghel L, Sascău R, Radu R, Stătescu C. From classical laboratory parameters to novel biomarkers for the diagnosis of venous thrombosis. Vol. 21, *International Journal of Molecular Sciences.* 2020.
 22. Metz AK, Diaz JA, Obi AT, Wakefield TW, Myers DD, Henke PK. Venous Thrombosis and Post-Thrombotic Syndrome: From Novel Biomarkers to Biology. Vol. 14, *Methodist DeBakey cardiovascular journal.* 2018.
 23. Di Nisio M, Squizzato A, Rutjes AWS, Büller HR, Zwinderman AH, Bossuyt PMM. Diagnostic accuracy of D-dimer test for exclusion of venous thromboembolism: A systematic review. *J Thromb Haemost.* 2007;5(2).
 24. Parakh RS, Sabath DE. Venous Thromboembolism: Role of the Clinical Laboratory in Diagnosis and Management. Vol. 3, *The journal of applied laboratory medicine.* 2019.
 25. Bates SM, Jaeschke R, Stevens SM, Wells PS, Stevenson MD, Kearon C, et al. Diagnosis of DVT: Antithrombotic Therapy and Prevention of Thrombosis, 9th ed. *CHEST J.* 2012;
 26. Righini M, Van Es J, Den Exter PL, Roy PM, Verschuren F, Ghuyssen A, et al. Age-adjusted D-dimer cutoff levels to rule out pulmonary embolism: The ADJUST-PE study. *JAMA - J Am Med Assoc.* 2014;311(11).
 27. Vandy FC, Stabler C, Eliassen AM, Hawley AE, Guire KE, Myers DD, et al. Soluble P-selectin for the diagnosis of lower extremity deep venous thrombosis. In: *Journal of Vascular Surgery: Venous and Lymphatic Disorders.* 2013.
 28. Silva LQ, Montalvão SAL, Justo-Junior ADS et al. Platelet-rich plasma lyophilization enables growth factor preservation and functionality when compared with fresh platelet-rich plasma. *Regen Med.* 2018;13(7).
 29. Wells PS, Anderson DR, Rodger M, Forgie M, Kearon C, Dreyer J, et al. Evaluation of D-Dimer in the Diagnosis of Suspected Deep-Vein Thrombosis. *N Engl J Med.* 2003;349(13).
 30. Mosevoll KA, Lindås R, Tvedt THA, Bruserud O, Reikvam H. Altered plasma levels of cytokines, soluble adhesion molecules and matrix metalloproteases in venous thrombosis. *Thromb Res.* 2015;136(1).
 31. Blann AD, Noteboom WMP, Rosendaal FR. Increased soluble P-selectin levels following deep venous thrombosis: Cause or effect? *Br J Haematol.* 2000;108(1).
 32. Papalambros E, Sigala F, Travlou A, Bastounis E, Mirilas P. P-selectin and antibodies against heparin-platelet factor 4 in patients with venous or arterial diseases after a 7-day heparin treatment. *J Am Coll Surg.* 2004;199(1).
 33. Folsom AR, Lutsey PL, Astor BC, Cushman M. C-reactive protein and venous thromboembolism: A prospective investigation in the ARIC cohort. *Thromb Haemost.* 2009;102(4).
 34. Zacho J, Tybjaerg-Hansen A, Nordestgaard BG. C-reactive protein and risk of venous thromboembolism in the general population. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2010;30(8).
 35. Fox EA, Kahn SR. The relationship between inflammation and venous thrombosis. A systematic review of clinical studies. Vol. 94, *Thrombosis and Haemostasis.* 2005.
 36. Tsai AW, Cushman M, Rosamond WD, Heckbert SR, Tracy RP, Aleksic N, et al.

- Coagulation factors, inflammation markers, and venous thromboembolism: The longitudinal investigation of thromboembolism etiology (LITE). *Am J Med.* 2002;113(8).
37. Reitsma PH, Rosendaal FR. Activation of innate immunity in patients with venous thrombosis: The Leiden Thrombophilia Study. *J Thromb Haemost.* 2004;2(4).
 38. Poredos P, Jezovnik MK. In patients with idiopathic venous thrombosis, interleukin-10 is decreased and related to endothelial dysfunction. *Heart Vessels.* 2011;26(6).
 39. Osnes LTN, Westvik ÅB, Joø GB, Okkenhaug C, Kierulf P. Inhibition of IL-1 induced tissue factor (TF) synthesis and procoagulant activity (PCA) in purified human monocytes by IL-4, IL-10 and IL-13. *Cytokine.* 1996;8(11).
 40. Deanfield JE, Halcox JP, Rabelink TJ. Endothelial function and dysfunction: Testing and clinical relevance. Vol. 115, *Circulation.* 2007.
 41. Galley HF, Webster NR. Physiology of the endothelium. *Br J Anaesth.* 2004;93(1).
 42. Huber SC, de Lima Montalvão SA, Sachetto Z, Santos Duarte Lana JF, Annichino-Bizzacchi JM. Characterization of autologous platelet rich plasma (PRP) and its biological effects in patients with Behçet's Disease. *Regen Ther.* 2021;18:339–46.
 43. Pober JS, Sessa WC. Evolving functions of endothelial cells in inflammation. *Nature Reviews Immunology.* 2007.
 44. Cahill PA, Redmond EM. Vascular endothelium - Gatekeeper of vessel health. Vol. 248, *Atherosclerosis.* 2016.
 45. Rodrigues BL, Montalvão SA, Cancela RB, Silva FA, Urban A, Huber SC, et al. "Treatment of male pattern alopecia with platelet-rich plasma: a double blind controlled study with analysis of platelet number and growth factor levels." *J Am Acad Dermatol* [Internet]. 2018; Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0190962218326434>
 46. Vapaatalo H, Mervaala E. Clinically important factors influencing endothelial function. Vol. 7, *Medical Science Monitor.* 2001.
 47. Solovey A, Lin Y, Browne P, Choong S, Wayner E, Hebbel RP. Circulating Activated Endothelial Cells in Sickle Cell Anemia. *N Engl J Med.* 1997;
 48. Levy M, Bonnet D, Mauge L, Celermajer DS, Gaussem P, Smadja DM. Correction: Circulating endothelial cells in refractory pulmonary hypertension in children: Markers of treatment efficacy and clinical worsening (PLoS ONE). *PLoS ONE.* 2014.
 49. Damani S, Bacconi A, Libiger O, Chourasia AH, Serry R, Gollapudi R, et al. Characterization of circulating endothelial cells in acute myocardial infarction. *Sci Transl Med.* 2012;
 50. Sabatier F, Camoin-Jau L, Anfosso F, Sampol J, Dignat-George F. Circulating endothelial cells, microparticles and progenitors: Key players towards the definition of vascular competence. Vol. 13, *Journal of Cellular and Molecular Medicine.* 2009.
 51. Dignat-George F, Sampol J. Circulating endothelial cells in vascular disorders: New insights into an old concept. *European Journal of Haematology.* 2000.
 52. Lin Y, Weisdorf DJ, Solovey A, Hebbel RP. Origins of circulating endothelial cells and endothelial outgrowth from blood. *J Clin Invest.* 2000;
 53. Asahara T, Murohara T, Sullivan A, Silver M, Van Der Zee R, Li T, et al. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science* (80-). 1997;

54. Ingram DA, Mead LE, Tanaka H, Meade V, Fenoglio A, Mortell K, et al. Identification of a novel hierarchy of endothelial progenitor cells using human peripheral and umbilical cord blood. *Blood*. 2004;104(9).
55. Fadini GP, Losordo D, Dimmeler S. Critical reevaluation of endothelial progenitor cell phenotypes for therapeutic and diagnostic use. Vol. 110, *Circulation Research*. 2012.
56. Chambers SEJ, Pathak V, Pedrini E, Soret L, Gendron N, Guerin CL, et al. Current concepts on endothelial stem cells definition, location, and markers. Vol. 10, *Stem Cells Translational Medicine*. 2021.
57. Hristov M, Weber C. Endothelial progenitor cells: Characterization, pathophysiology, and possible clinical relevance. Vol. 8, *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. 2004.
58. Lacaud G, Kouskoff V. Hemangioblast, hemogenic endothelium, and primitive versus definitive hematopoiesis. Vol. 49, *Experimental Hematology*. 2017.
59. Medina RJ, Barber CL, Sabatier F, Dignat-George F, Melero-Martin JM, Khosrotehrani K, et al. Endothelial progenitors: A consensus statement on nomenclature. *Stem Cells Transl Med*. 2017;6(5).
60. Gulati R, Jevremovic D, Peterson TE, Chatterjee S, Shah V, Vile RG, et al. Diverse Origin and Function of Cells with Endothelial Phenotype Obtained from Adult Human Blood. *Circ Res*. 2003;93(11).
61. Banno K, Yoder MC. Tissue regeneration using endothelial colony-forming cells: Promising cells for vascular repair. Vol. 83, *Pediatric Research*. 2018.
62. Reid E, Guduric-Fuchs J, O'Neill CL, Allen L-D, Chambers SEJ, Stitt AW, et al. Preclinical Evaluation and Optimization of a Cell Therapy Using Human Cord Blood-Derived Endothelial Colony-Forming Cells for Ischemic Retinopathies. *Stem Cells Transl Med*. 2018 Jan;7(1):59–67.
63. de Boer S, Bowman M, Notley C, Mo A, Lima P, de Jong A, et al. Endothelial characteristics in healthy endothelial colony forming cells; generating a robust and valid ex vivo model for vascular disease. *J Thromb Haemost*. 2020;
64. Smadja DM, Cornet A, Emmerich J, Aiach M, Gaussem P. Endothelial progenitor cells: Characterization, in vitro expansion, and prospects for autologous cell therapy. In: *Cell Biology and Toxicology*. 2007.
65. van Beem RT, Verloop RE, Kleijer M, Noort WA, Loof N, Koolwijk P, et al. Blood outgrowth endothelial cells from cord blood and peripheral blood: Angiogenesis-related characteristics in vitro. *J Thromb Haemost*. 2009;7(1).
66. Alessio AM, Beltrame MP, Flores Nascimento MC, Vicente CP, de Godoy JAP, Santos Silva JCR, et al. Circulating progenitor and mature endothelial cells in deep vein thrombosis. *Int J Med Sci*. 2013;
67. Alvarado-Moreno JA, Hernandez-Lopez R, Chavez-Gonzalez A, Yoder MC, Rangel-Corona R, Isordia-Salas I, et al. Endothelial colony-forming cells: Biological and functional abnormalities in patients with recurrent, unprovoked venous thromboembolic disease. *Thromb Res*. 2016;137.
68. Hernandez-Lopez R, Chavez-Gonzalez A, Torres-Barrera P, Moreno-Lorenzana D, Lopez-DiazGuerrero N, Santiago-German D, et al. Reduced proliferation of endothelial colony-forming cells in unprovoked venous thromboembolic disease as a consequence of endothelial dysfunction. *Vinci MC*, editor. *PLoS One*. 2017 Sep;12(9):e0183827.
69. Kahn SR, Shrier I, Julian JA, Ducruet T, Arsenault L, Miron MJ, et al. Determinants and time course of the postthrombotic syndrome after acute deep venous thrombosis. *Ann Intern Med*. 2008;

70. Prandoni P, Lensing AWA, Prins MH, Bernardi E, Marchiori A, Bagatella P, et al. Residual venous thrombosis as a predictive factor of recurrent venous thromboembolism. *Ann Intern Med.* 2002;
71. Sakamoto TM, Lanaro C, Ozelo MC, Garrido VT, Olalla-Saad ST, Conran N, et al. Increased adhesive and inflammatory properties in blood outgrowth endothelial cells from sickle cell anemia patients. *Microvasc Res.* 2013;90.
72. Castoldi E, Rosing J. Thrombin generation tests. *Thromb Res.* 2011;127(SUPPL. 3).
73. Borow M, Goldson HJ. Prevention of postoperative deep venous thrombosis and pulmonary emboli with combined modalities. *Am Surg.* 1983;49(11).
74. Mosevoll KA, Johansen S, Wendelbo Ø, Nepstad I, Bruserud Ø, Reikvam H. Cytokines, adhesion molecules, and matrix metalloproteases as predisposing, diagnostic, and prognostic factors in venous thrombosis. Vol. 5, *Frontiers in Medicine.* 2018.
75. Matos MF, Lourenço DM, Orikaza CM, Bajerl JAH, Noguti MAE, Morelli VM. The role of IL-6, IL-8 and MCP-1 and their promoter polymorphisms IL-6 -174GC, IL-8 -251AT and MCP-1 -2518AG in the risk of venous thromboembolism: A case-control study. *Thromb Res.* 2011;128(3).
76. Schaper F, Rose-John S. Interleukin-6: Biology, signaling and strategies of blockade. Vol. 26, *Cytokine and Growth Factor Reviews.* 2015.
77. Rabinovich A, Cohen JM, Cushman M, Kahn SR, Anderson DR, Chagnon I, et al. Association between inflammation biomarkers, anatomic extent of deep venous thrombosis, and venous symptoms after deep venous thrombosis. *J Vasc Surg Venous Lymphat Disord.* 2015;3(4).
78. Andrae J, Gallini R, Betsholtz C. Role of platelet-derived growth factors in physiology and medicine. Vol. 22, *Genes and Development.* 2008.
79. Harlan JM, Thompson PJ, Ross RR, Bowen-Pope DF. α -Thrombin induces release of platelet-derived growth factor-like molecule(s) by cultured human endothelial cells. *J Cell Biol.* 1986;103(3).
80. 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. Vol. 11, *Frontiers in Pharmacology.* 2020.
81. Schini-Kerth VB, Bassus S, Fisslthaler B, Kirchmaier CM, Busse R. Aggregating human platelets stimulate the expression of thrombin receptors in cultured vascular smooth muscle cells via the release of transforming growth factor- β 1 and platelet-derived growth factor(AB). *Circulation.* 1997;96(11).
82. André P. P-selectin in haemostasis. Vol. 126, *British Journal of Haematology.* 2004.
83. J. Woollard K, Chin-Dusting J. P-Selectin Antagonism in Inflammatory Disease. *Curr Pharm Des.* 2011;16(37).
84. Gremmel T, Ay C, Seidinger D, Pabinger I, Panzer S, Koppensteiner R. Soluble p-selectin, D-dimer, and high-sensitivity C-reactive protein after acute deep vein thrombosis of the lower limb. *J Vasc Surg.* 2011;54(6 SUPPL.).
85. Rectenwald JE, Myers DD, Hawley AE, Longo C, Henke PK, Guire KE, et al. D-dimer, P-selectin, and microparticles: Novel markers to predict deep venous thrombosis: A pilot study. *Thromb Haemost.* 2005;94(6).
86. O'Hanlon DM, Fitzsimons H, Lynch J, Tormey S, Malone C, Given HF. Soluble adhesion molecules (E-selectin, ICAM-1 and VCAM-1) in breast carcinoma. *Eur J Cancer.* 2002;38(17).

87. Flores-Nascimento MC, Alessio AM, de Andrade Orsi FL, Annichino-Bizzacchi JM. CD144, CD146 and VEGFR-2 properly identify circulating endothelial cell. *Rev Bras Hematol Hemoter.* 2015;
88. Erdbruegger U, Dhaygude A, Haubitz M, Woywodt A. Circulating Endothelial Cells: Markers and Mediators of Vascular Damage. *Curr Stem Cell Res Ther.* 2010;5(4).
89. Sbarbati R, De Boer M, Marzilli M, Scarlattini M, Rossi G, Van Mourik JA. Immunologic detection of endothelial cells in human whole blood. *Blood.* 1991;77(4).
90. George F, Brisson C, Poncelet P, Laurent JC, Massot O, Arnoux D, et al. Rapid isolation of human endothelial cells from whole blood using S-Endo1 monoclonal antibody coupled to Immuno-Magnetic beads: Demonstration of endothelial injury after angioplasty. *Thromb Haemost.* 1992;67(1).
91. Mutin M, Canavy I, Blann A, Bory M, Sampol J, Dignat-George F. Direct evidence of endothelial injury in acute myocardial infarction and unstable angina by demonstration of circulating endothelial cells. *Blood.* 1999;93(9).
92. Solovey A, Gui L, Key NS, Hebbel RP. Tissue factor expression by endothelial cells in sickle cell anemia. *J Clin Invest.* 1998;101(9).
93. Ito MT, da Silva Costa SM, Baptista LC, Carvalho-Siqueira GQ, Albuquerque DM, Rios VM, et al. Angiogenesis-Related Genes in Endothelial Progenitor Cells May Be Involved in Sickle Cell Stroke. *J Am Heart Assoc.* 2020;
94. Smadja DM, Bièche I, Helley D, Laurendeau I, Simonin G, Muller L, et al. Increased VEGFR2 expression during human late endothelial progenitor cells expansion enhances in vitro angiogenesis with up-regulation of integrin $\alpha 6$. *J Cell Mol Med.* 2007;11(5).
95. Lyons CJ, O'Brien T. The Functionality of Endothelial-Colony-Forming Cells from Patients with Diabetes Mellitus. Vol. 9, *Cells.* 2020.
96. Alsaffar H, Martino N, Garrett JP, Adam AP. Interleukin-6 promotes a sustained loss of endothelial barrier function via janus kinase-mediated STAT3 phosphorylation and de novo protein synthesis. *Am J Physiol - Cell Physiol.* 2020;314(5).
97. Kang S, Kishimoto T. Interplay between interleukin-6 signaling and the vascular endothelium in cytokine storms. Vol. 53, *Experimental and Molecular Medicine.* 2021.
98. Dubois C, Liu X, Claus P, Marsboom G, Pokreisz P, Vandenwijngaert S, et al. Differential Effects of Progenitor Cell Populations on Left Ventricular Remodeling and Myocardial Neovascularization After Myocardial Infarction. *J Am Coll Cardiol.* 2010;55(20).
99. Ding J, Zhao Z, Wang C, Wang CX, Li PC, Qian C, et al. Bioluminescence imaging of transplanted human endothelial colony-forming cells in an ischemic mouse model. *Brain Res.* 2016;1642.
100. Schwarz TM, Leicht SF, Radic T, Rodriguez-Araboalaza I, Hermann PC, Berger F, et al. Vascular incorporation of endothelial colony-forming cells is essential for functional recovery of murine ischemic tissue following cell therapy. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2012;32(2).
101. Burger D, Viñas JL, Akbari S, Dehak H, Knoll W, Gutsol A, et al. Human Endothelial Colony-Forming Cells Protect against Acute Kidney Injury Role of Exosomes. *Am J Pathol.* 2015;185(8).
102. Kurz DJ, Decary S, Hong Y, Erusalimsky JD. Senescence-associated β -galactosidase reflects an increase in lysosomal mass during replicative ageing

- of human endothelial cells. *J Cell Sci.* 2000;113(20).
103. Noren Hooten N, Evans MK. Techniques to induce and quantify cellular senescence. *J Vis Exp.* 2017;2017(123).
 104. Chen QM, Prowse KR, Tu VC, Purdom S, Linskens MHK. Uncoupling the senescent phenotype from telomere shortening in hydrogen peroxide-treated fibroblasts. *Exp Cell Res.* 2001;265(2).
 105. Bai H, Gao Y, Hoyle DL, Cheng T, Wang ZZ. Suppression of Transforming Growth Factor- β Signaling Delays Cellular Senescence and Preserves the Function of Endothelial Cells Derived from Human Pluripotent Stem Cells. *Stem Cells Transl Med.* 2017;6(2).
 106. Shay JW, Wright WE. Telomeres and telomerase: Implications for cancer and aging. *Radiat Res.* 2001;155(1).
 107. Bochenek ML, Schütz E, Schäfer K. Endothelial cell senescence and thrombosis: Ageing clots. Vol. 147, *Thrombosis Research.* 2016.
 108. Jarajapu YPR, Hazra S, Segal M, LiCalzi S, Jhadoo C, Qian K, et al. Vasoreparative dysfunction of CD34+ cells in diabetic individuals involves hypoxic desensitization and impaired autocrine/paracrine mechanisms. *PLoS One.* 2014;9(4).
 109. Catieau B, Devos V, Chtourou S, Borgel D, Plantier JL. Endothelial cell surface limits coagulation without modulating the antithrombin potency. *Thromb Res.* 2018;
 110. Verhamme P, Hoylaerts MF. The pivotal role of the endothelium in haemostasis and thrombosis. Vol. 61, *Acta Clinica Belgica.* 2006.
 111. Wang M, Hao H, Leeper NJ, Zhu L. Thrombotic Regulation From the Endothelial Cell Perspectives. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology.* 2018.
 112. Yau JW, Teoh H, Verma S. Endothelial cell control of thrombosis. *BMC Cardiovascular Disorders.* 2015.
 113. Kim JE, Yoo HJ, Gu JY, Kim HKK. Histones induce the procoagulant phenotype of endothelial cells through tissue factor up-regulation and thrombomodulin down-regulation. *PLoS One.* 2016;
 114. Billoir P, Miranda S, Damian L, Richard V, Benhamou Y, Le Cam Duchez V. Development of a thrombin generation test in cultured endothelial cells: Evaluation of the prothrombotic effects of antiphospholipid antibodies. *Thromb Res.* 2018;
 115. Billoir P, Blandinières A, Gendron N, Chocron R, Gunther S, Philippe A, et al. Endothelial Colony-Forming Cells from Idiopathic Pulmonary Fibrosis Patients Have a High Procoagulant Potential. *Stem Cell Rev Reports.* 2020;
 116. Vestweber D. How leukocytes cross the vascular endothelium. Vol. 15, *Nature Reviews Immunology.* 2015.
 117. Smadja DM, Melero-Martin JM, Eikenboom J, Bowman M, Sabatier F, Randi AM. Standardization of methods to quantify and culture endothelial colony-forming cells derived from peripheral blood: Position paper from the International Society on Thrombosis and Haemostasis SSC. *J Thromb Haemost.* 2019;
 118. Paschalaki KE, Starke RD, Hu Y, Mercado N, Margariti A, Gorgoulis VG, et al. Dysfunction of endothelial progenitor cells from smokers and chronic obstructive pulmonary disease patients due to increased dna damage and senescence. *Stem Cells.* 2013;31(12).
 119. Shbaklo H, Holcroft CA, Kahn SR. Levels of inflammatory markers and the development of the post-thrombotic syndrome. *Thromb Haemost.* 2009;
 120. Rabinovich A, Cohen JM, Cushman M, Wells PS, Rodger MA, Kovacs MJ, et al.

- Inflammation markers and their trajectories after deep vein thrombosis in relation to risk of post-thrombotic syndrome. *J Thromb Haemost.* 2015;
121. Zapponi KCS, Orsi FA, Cunha JLR, de Brito IR, Romano AVC, Bittar LF, et al. Neutrophil activation and circulating neutrophil extracellular traps are increased in venous thromboembolism patients for at least one year after the clinical event. *J Thromb Thrombolysis.* 2021;

8. ANEXOS

ANEXO 1 – TCLE

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

“Avaliação da atividade de células endoteliais formadoras de colônia (CEFCs) circulantes em pacientes com trombose venosa espontânea e provocada “

Pesquisadores responsáveis: Letícia Queiroz da Silva e Joyce Maria Annichino-Bizzacchi

Número do CAAE: 95633818.1.0000.5404

Você está sendo convidado a participar como voluntário de uma pesquisa. Este documento, chamado Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, visa assegurar seus direitos como participante e é elaborado em duas vias, uma que deverá ficar com você e outra com o pesquisador.

Por favor, leia com atenção e calma, aproveitando para esclarecer suas dúvidas. Se houver perguntas antes ou mesmo depois de assiná-lo, você poderá esclarecê-las com o pesquisador. Se preferir, pode levar este Termo para casa e consultar seus familiares ou outras pessoas antes de decidir participar. Não haverá nenhum tipo de penalização ou prejuízo se você não aceitar participar ou retirar sua autorização em qualquer momento.

Justificativa e objetivos:

Nesta pesquisa, vamos avaliar a atividade das células endoteliais progenitoras (CEFCs) em pacientes com trombose venosa profunda (TVP) espontânea e provocada.

Basicamente, a TVP é uma doença causada pela coagulação do sangue (desenvolvimento de um trombo) no interior dos vasos sanguíneos, em um local ou momento não adequados, podendo bloquear o fluxo sanguíneo.

O endotélio, camada celular que reveste interiormente os vasos, quando disfuncional pode liberar as CEFCs para circulação, sendo um possível marcador celular para diversas doenças. No entanto, pouco se sabe sobre o papel das CEFCs na trombose e nenhum estudo avalia o efeito dessas células em pacientes sem o uso de anticoagulação oral.

O objetivo deste trabalho será avaliar a atividade a função das CEFCs bem como sua interface com a hemostasia em pacientes com TVP espontânea e provocada, comparados a indivíduos saudáveis.

Procedimentos:

Participando do estudo você está sendo convidado a **doar seu sangue em um volume total de 60 mL** em tubos de heparina sódica, EDTA e citrato de sódio 3,2% em tubos a vácuo livres de contaminação. Esses tubos irão passar por um processo de centrifugação, o plasma (porção líquida do seu sangue) será aspirado e armazenado à - 80° C e com o tubo de EDTA será realizado um hemograma.

A coleta de sangue será realizada uma vez ou duas em caso de necessidade de repetição. No entanto, será realizada em momentos que o senhor (a) já estará na Unicamp, não havendo necessidade de locomoção e jejum apenas para a pesquisa. Sendo a coleta de sangue na sala de coleta do Ambulatório de Hematologia do Hemocentro (telefone 3521-8679), por funcionárias altamente capacitadas.

O processamento e análise da amostra será realizado no Laboratório de Hemostasia/ Hemocentro – Unicamp.

Desconfortos e riscos:

Dentre os possíveis riscos do voluntário com a doação de sangue para esta pesquisa, destacamos hematoma (mancha roxa) e/ou pequena dor no local da punção venosa. Para evitar o aparecimento do hematoma, sugerimos pressionar o local durante no mínimo 3 minutos após a coleta, evitar dobrar o braço em que foi realizado a coleta, mantê-lo suspenso por alguns minutos e não fazer esforço físico durante a primeira hora.

Caso haja o aparecimento de hematoma, colocar compressas de gelo por 15 minutos a cada hora nas primeiras seis horas. Se necessário pode-se prolongar este tempo por mais 2 ou 3 horas.

Benefícios:

O benefício esperado com a sua participação será a contribuição para melhor conhecimento na fisiopatologia da doença, especialmente sobre a atividade endotelial em relação ao paciente com trombose provocada e espontânea.

O benefício aos voluntários é a verificação da influência da atividade endotelial aos pacientes com trombose. Caso resultados sejam promissores em relação a identificação do papel das CEFCs (sejam consideradas a marcadores ou promotores da doença) na trombose, a sua prevenção que poderá evitar a realização de futuros eventos trombóticos.

Acompanhamento e assistência:

Qualquer forma de acompanhamento ou assistência médica de danos decorrentes a procedimentos da pesquisa será dada ao participante da pesquisa após o momento da coleta de sangue, caso haja necessidade.

Sigilo e privacidade:

Você tem a garantia de que sua identidade será mantida em sigilo e nenhuma informação será dada a outras pessoas que não façam parte da equipe de pesquisadores. Na divulgação dos resultados desse estudo, seu nome não será citado.

Ressarcimento e indenização:

Como o estudo será feito durante em períodos que você já estará no hospital para retorno médico não haverá necessidade de ressarcimento para transporte e alimentação

No entanto, você terá a garantia ao direito a indenização diante de eventuais danos decorrentes da pesquisa.

Armazenamento de Material Biológico:

Caso além de participar da pesquisa você concorde em manter a amostra coletada armazenada no Biorrepositório do Laboratório de Hemostasia do Hemocentro da UNICAMP, assine na primeira opção baixo. Neste caso, você deve estar ciente que esta amostra só poderá ser utilizada após sua autorização. Caso não concorde, assine seu nome diante da segunda opção:

() concordo em participar do presente estudo e **AUTORIZO** o armazenamento do meu material biológico, sendo necessário meu consentimento a cada nova pesquisa, que deverá ser aprovada pelo CEP institucional e, se for o caso, pela CONEP.

() concordo em participar do presente estudo, porém **NÃO AUTORIZO** o armazenamento do meu material biológico, devendo o mesmo ser descartado ao final desta pesquisa

Você, ou seu representante legal, a qualquer tempo e sem quaisquer ônus ou prejuízos, pode retirar o consentimento da guarda e utilização do seu material biológico armazenado. Em caso de falecimento ou condição incapacitante, os direitos sobre o material armazenado deverão ser dados a:

Contato:

Em caso de dúvidas sobre a pesquisa, você poderá entrar em contato com a pesquisadora Letícia Queiroz do Laboratório de Hemostasia/Hemocentro – UNICAMP (Telefone: 19 – 3521-8755). Horário de funcionamento: 08:30hs às 11:30hs e 13:00hs às 17:00.

Em caso de denúncias ou reclamações sobre sua participação e sobre questões éticas do estudo, você poderá entrar em contato com a secretaria do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da UNICAMP das 08:30hs às 11:30hs e das 13:00hs as 17:00hs na Rua: Tessália Vieira de Camargo, 126; CEP 13083-887 Campinas – SP; telefone (19) 3521-8936 ou (19) 3521-7187; e-mail: cep@fcm.unicamp.br.

O Comitê de Ética em Pesquisa (CEP).

O papel do CEP é avaliar e acompanhar os aspectos éticos de todas as pesquisas envolvendo seres humanos. A Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP), tem por objetivo desenvolver a regulamentação sobre proteção dos seres humanos envolvidos nas pesquisas. Desempenha um papel coordenador da rede de Comitês de Ética em Pesquisa (CEPs) das instituições, além de assumir a função de órgão consultor na área de ética em pesquisas

Consentimento livre e esclarecido:

Após ter recebido esclarecimentos sobre a natureza da pesquisa, seus objetivos, métodos, benefícios previstos, potenciais riscos e o incômodo que esta possa acarretar, aceito participar e declaro estar recebendo uma via original deste documento assinada pelo pesquisador e por mim, tendo todas as folhas por nós rubricadas:

Nome do (a) participante:

Contato telefônico:

e-mail (opcional):

Data: ____/____/____.

(Assinatura do participante ou nome e assinatura do seu RESPONSÁVEL
LEGAL)

Responsabilidade do Pesquisador:

Asseguro ter cumprido as exigências da resolução 466/2012 CNS/MS e complementares na elaboração do protocolo e na obtenção deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Asseguro, também, ter explicado e fornecido uma via deste documento ao participante. Informo que o estudo foi aprovado pelo CEP perante o qual o projeto foi apresentado. Comprometo-me a utilizar o material e os dados obtidos nesta pesquisa exclusivamente para as finalidades previstas neste documento ou conforme o consentimento dado pelo participante.

____/____/____.

(Assinatura do pesquisador)

_____ Data:

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

“INVESTIGAÇÃO DE MARCADORES SÉRICOS E CELULARES E ULTRASSOM COM DOPPLER EM TROMBOSE VENOSA AGUDA DE MEMBROS INFERIORES “

Pesquisadores responsáveis: Letícia Queiroz da Silva, Francileide dos Santos Sousa de Araújo, Isabela Macedo Toni, Stephany Cares Huber, Beatriz de Moraes Martinelli, Silmara Aparecida de Lima Montalvão, Arlindo Nascimento de Lemos Júnior, Sérgio San Juan Dertkigil e Joyce Maria Annichino-Bizzacchi.

Número do CAAE: 28642619.3.0000.5404

Você está sendo convidado a participar como voluntário de uma pesquisa. Este documento, chamado Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, visa assegurar seus direitos como participante e é elaborado em duas vias, uma que deverá ficar com você e outra com o pesquisador.

Por favor, leia com atenção e calma, aproveitando para esclarecer suas dúvidas. Se houver perguntas antes ou mesmo depois de assiná-lo, você poderá esclarecê-las com o pesquisador. Se preferir, pode levar este Termo para casa e consultar seus familiares ou outras pessoas antes de decidir participar. Não haverá nenhum tipo de penalização ou prejuízo se você não aceitar participar ou retirar sua autorização em qualquer momento.

Justificativa e objetivos:

Nesta pesquisa, vamos avaliar os mecanismos envolvidos em pacientes com diagnóstico de trombose venosa profunda (TVP) aguda e sua evolução.

Basicamente, a TVP é uma doença causada pela coagulação do sangue (desenvolvimento de um trombo) no interior dos vasos sanguíneos, em um local ou momento não adequados, podendo bloquear o fluxo sanguíneo. Geralmente é causada por fatores adquiridos (exemplo idade > 65 anos; obesidade; gravidez; cirurgias, viagens de longo período) ou espontâneos, as quais não se sabe o agente causador da doença. Importante destacar que há um risco de recorrência de 25 % nos primeiros 5 anos e as vezes em pacientes que ainda fazem uso de anticoagulantes.

O exame de ultrassom *doppler* é o principal exame para diagnóstico da TVP e sua realização durante e após o tratamento da doença é essencial para verificar a presença do trombo.

Sendo assim, o objetivo do trabalho será avaliar em pacientes com TVP aguda a atividade de marcadores biológicos, células endoteliais, fibrinólise através do sangue e sua evolução. Além disso, o exame de imagem ultrassom *doppler* será realizado 6 e 12 meses após o diagnóstico da doença.

Procedimentos:

Participando do estudo você está sendo convidado a conceder o uso do seu sangue em um volume total de 61 mL em tubos livres de contaminação, após isso o processamento, análise e armazenamento da amostra será realizado no Laboratório de Hemostasia/ Hemocentro de Campinas – Unicamp.

Se você possui câncer, doença renal, hepática ou inflamatória em fase aguda, é etilista ou tabagista, iremos coletar apenas 25 mL de sangue.

Para ambos grupos, vamos acompanhar a evolução da sua doença durante 3 e 6 meses após a data do diagnóstico através de um novo ultrassom, coleta de sangue (61 mL ou 25 mL) e entrevista. Esta última será realizada novamente por telefone aos 12 e 24 meses após a TVP. Não será necessário realizar jejum alimentar.

As coletas serão realizadas na sala de coleta do Ambulatório de Hematologia do Hemocentro (telefone 3521-8679), por funcionárias altamente capacitadas e o exame de ultrassom será realizado no serviço de radiologia do HC da Unicamp, com horário e data agendados. Sendo assim, os pacientes recrutados nos hospitais de diagnósticos terão que se deslocar para Unicamp e os exames de sangue e ultrassom serão preferencialmente realizados no mesmo dia.

Caso você possua prontuário na Unicamp, seus dados poderão ser acessados para completar alguma informação que esteja faltando.

Desconfortos e riscos:

Dentre os possíveis riscos do voluntário com a concessão do uso de seu sangue para esta pesquisa, destacamos hematoma (mancha roxa) e/ou pequena dor no local da punção venosa. Para evitar o aparecimento do hematoma, sugerimos pressionar o local durante no mínimo 3 minutos após a coleta, evitar dobrar o braço em que foi realizado a coleta, mantê-lo suspenso por alguns minutos e não fazer esforço físico durante a primeira hora.

Caso haja o aparecimento de hematoma, colocar compressas de gelo por 15 minutos a cada hora nas primeiras seis horas. Se necessário pode-se prolongar este tempo por mais 2 ou 3 horas.

Além disso, destacamos um desconforto para o voluntário o tempo (± 10 minutos) despendido para a realização das entrevistas clínicas específicas.

Não há riscos ao realizar o exame de ultrassom, apenas um desconforto em relação ao movimento do transdutor caso a perna esteja inchada.

Benefícios:

O benefício esperado com a sua participação será a contribuição para melhor conhecimento na fisiopatologia da doença, especialmente na fase aguda.

O benefício direto por participar desta pesquisa, será no acompanhamento da evolução da doença e dissolução do trombo através dos exames de ultrassom. Além disso, as conclusões do estudo podem beneficiar pacientes com doenças semelhantes no futuro, por contribuir para o conhecimento de qual o tipo de teste poderá ser útil para monitorar a capacidade de coagular e dissolver esse coágulo de pacientes.

Você poderá optar por receber os resultados dos exames realizados.

Acompanhamento e assistência:

O participante tem direito a acompanhamento gratuito e imediato pelo tempo necessário na ocorrência de eventos adversos atrelados à participação na pesquisa. Se necessário, os pesquisadores irão acompanhar o paciente à um pronto socorro ou então os médicos e enfermeiros participantes do projeto poderão atender o voluntário.

Sigilo e privacidade:

Você tem a garantia de que sua identidade será mantida em sigilo e nenhuma informação será dada a outras pessoas que não façam parte da equipe de

pesquisadores. Na divulgação dos resultados desse estudo, seu nome não será citado.

Ressarcimento e Indenização:

Como o estudo será realizado na Unicamp, vamos ressarcir despesas relacionadas ao transporte utilizado para deslocamento até o hospital e alimentação, caso seja necessário. Além disso, garantimos também o ressarcimento dos acompanhantes.

Você terá a garantia ao direito à indenização diante de eventuais danos decorrentes da pesquisa.

Armazenamento de Material Biológico:

Sua amostra será importante para outros projetos que podem relatar novas descobertas e contribuem para o avanço da ciência, sendo assim caso além de participar da pesquisa você concorde em manter a amostra coletada armazenada em Biorrepositório no Laboratório de Hemostasia do Hemocentro da UNICAMP, por no máximo 10 anos, assine na primeira opção baixo. Neste caso, você deve estar ciente que esta amostra só poderá ser utilizada após sua autorização. Caso não concorde, assine a segunda alternativa:

() concordo em participar do presente estudo e **AUTORIZO** o armazenamento do meu material biológico, sendo necessário meu consentimento a cada nova pesquisa, que deverá ser aprovada pelo CEP institucional e, se for o caso, pela CONEP.

() concordo em participar do presente estudo, porém **NÃO AUTORIZO** o armazenamento do meu material biológico, devendo o mesmo ser descartado ao final desta pesquisa.

Você, ou seu representante legal, a qualquer tempo e sem quaisquer ônus ou prejuízos, pode retirar o consentimento da guarda e utilização do seu material biológico armazenado.

Em caso de falecimento ou condição incapacitante, os direitos sobre o material armazenado deverão ser dados a:

Contato:

Em caso de dúvidas sobre a pesquisa, você poderá entrar em contato com as pesquisadoras Letícia Queiroz, Stephany Huber, Beatriz Martinelli e/ou Isabela Toni do Laboratório de Hemostasia/Hemocentro – UNICAMP (Rua Carlos Chagas, 480 - Telefone: 19 – 3521-8755). Horário de funcionamento: 08:30hs às 11:30hs e 13:00hs às 17:00.

Em caso de denúncias ou reclamações sobre sua participação e sobre questões éticas do estudo, você poderá entrar em contato com a secretaria do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da UNICAMP das 08:30hs às 11:30hs e das 13:00hs as 17:00hs na Rua: Tessália Vieira de Camargo, 126; CEP 13083-887 Campinas – SP; telefone (19) 3521-8936 ou (19) 3521-7187; e-mail: cep@fcm.unicamp.br.

O Comitê de Ética em Pesquisa (CEP).

O papel do CEP é avaliar e acompanhar os aspectos éticos de todas as pesquisas envolvendo seres humanos. A Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP), tem por objetivo desenvolver a regulamentação sobre proteção dos seres humanos

envolvidos nas pesquisas. Desempenha um papel coordenador da rede de Comitês de Ética em Pesquisa (CEPs) das instituições, além de assumir a função de órgão consultor na área de ética em pesquisas

Consentimento livre e esclarecido:

Após ter recebido esclarecimentos sobre a natureza da pesquisa, seus objetivos, métodos, benefícios previstos, potenciais riscos e o incômodo que esta possa acarretar, aceito participar e declaro estar recebendo uma via original deste documento assinada pelo pesquisador e por mim, tendo todas as folhas por nós rubricadas:

Nome do (a) participante:

Contato telefônico:

Data:

____/____/____.

(Assinatura do participante ou nome e assinatura do seu RESPONSÁVEL LEGAL)

Responsabilidade do Pesquisador:

Asseguro ter cumprido as exigências da resolução 466/2012 CNS/MS e complementares na elaboração do protocolo e na obtenção deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Asseguro, também, ter explicado e fornecido uma via deste documento ao participante. Informo que o estudo foi aprovado pelo CEP perante o qual o projeto foi apresentado. Comprometo-me a utilizar o material e os dados obtidos nesta pesquisa exclusivamente para as finalidades previstas neste documento ou conforme o consentimento dado pelo participante.

Data:

____/____/____.

ANEXO 2 – FICHA REDCAP

Digitado: / /		RBC:		
	Hemocentro de Campinas - Laboratório de Hemostasia		Pág. 1 de 2	Data: / /
	AVALIAÇÃO DE PACIENTE COM HISTÓRICO DE TROMBOSE		Rev: 9 - Set/19	Responsável:

DADOS GERAIS									
Sexo:	Fem <input type="checkbox"/>	Masc <input type="checkbox"/>	Nome:						
HC:	Dt de Nasc.: / /		Etnia (Pode haver mais de uma)		Caucasiano <input type="checkbox"/>	Afrodescendente <input type="checkbox"/>	Oriental <input type="checkbox"/>	Índigena <input type="checkbox"/>	
Logradouro:				Nº:	Compl.:				
Bairro:			Cidade/estado:				CEP:		
Telefones:				E-mail: ou rede social					
Escolaridade:		Fundam. <input type="checkbox"/>	Médio <input type="checkbox"/>	Técnico <input type="checkbox"/>	Superior <input type="checkbox"/>	Ausente <input type="checkbox"/>	Completo <input type="checkbox"/>	Incompleto <input type="checkbox"/>	Profissão:

DADOS ATUAIS									
Altura:	Comorbidades: (Atuais)								
Peso:	Especifique:								
Medicamentos:									
Alcoolismo:	Tempo com o hábito:	Há quanto tempo parou?	Tabagismo:	Tempo com o hábito:	Há quanto tempo parou?	Cigarros por dia:	Outras drogas:	Quais:	
Não <input type="checkbox"/>	Sim <input type="checkbox"/>	Parou <input type="checkbox"/>	Não <input type="checkbox"/>	Sim <input type="checkbox"/>	Parou <input type="checkbox"/>		Não <input type="checkbox"/>	Sim <input type="checkbox"/>	

PERFIL TROMBÓTICO					Discriminar nº de parentes e locais de ocorrência abaixo:					
Nº total de eventos					Nº		Local(is)			
					Pai				Tios pat.	
Locais (só eventos não especificados)					Mãe				Tios mat.	
					Irmãos				Avós pat.	
Parentes com IAM, AVC ou TVP (antes dos 50 anos)					Filhos				Avós mat.	
					Sobrinhos				Netos	

EVENTO _____										
Esponâneo <input type="checkbox"/>					Provocado <input type="checkbox"/>					
Data do diagnóstico: / /			Local de ocorrência:			Confirmado por imagem: Não <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/>				
Usou anticoag.: (na época)		Não <input type="checkbox"/>	Sim <input type="checkbox"/>	Qual:		Tempo de uso:		Tempo entre sintomas e tratamento:		
Peso: (na época)		Comorbidades: (na época)								
		Disf. Hepática <input type="checkbox"/>	Insuf. Renal <input type="checkbox"/>	Diabetes <input type="checkbox"/>	Dislipidemia <input type="checkbox"/>	HAS <input type="checkbox"/>	Auto-imune <input type="checkbox"/>	Hematol. <input type="checkbox"/>	Outras <input type="checkbox"/>	
Especifique: (na época)										
Medicamentos: (na época)										
Imobilização, Cirurgia ou Internação			Não <input type="checkbox"/>	Sim <input type="checkbox"/>	Motivo:			Duração:		
Câncer		Não <input type="checkbox"/>	Sim <input type="checkbox"/>	Qual:		Quimioterapia: (até três meses):		Não <input type="checkbox"/>	Sim <input type="checkbox"/>	
Traumas de MMII:		Não <input type="checkbox"/>	Sim <input type="checkbox"/>	Infecção: (3 meses anteriores)		Não <input type="checkbox"/>	Sim <input type="checkbox"/>	Especifique:		
Viagem longa: (no mês anterior)		Não <input type="checkbox"/>	Sim <input type="checkbox"/>	Veículo:			Duração:			
Anticoncepcional ou repos. hormonal (na época)					Não <input type="checkbox"/>	Sim <input type="checkbox"/>	Qual:			
Gestação no período: (Pós parto até o 3º mês)					Não <input type="checkbox"/>	1º trim. <input type="checkbox"/>	2º trim. <input type="checkbox"/>	3º trim. <input type="checkbox"/>	Pós Parto <input type="checkbox"/>	Parto: Vaginal <input type="checkbox"/> Cesária <input type="checkbox"/>
							Estimulo hormonal:		Não <input type="checkbox"/>	Sim <input type="checkbox"/>

		AVALIAÇÃO DE PACIENTE COM HISTÓRICO DE TROMBOSE						Pág. 2 de 2																	
EVENTO _____		Espontaneo <input type="checkbox"/>		Provocado <input type="checkbox"/>																					
Data do diagnóstico: / /		Local de ocorrência:				Confirmado por imagem: Não <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/>																			
Usou anticoag.: Não <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Qual:		Tempo de uso:				Tempo entre sintomas e tratamento:																			
Peso: (na época)		Comorbidades: (na época)		Disf.Hepática <input type="checkbox"/>		Insuf. Renal <input type="checkbox"/>		Diabetes <input type="checkbox"/>		Dislipidemia <input type="checkbox"/>		HAS <input type="checkbox"/>		Auto-imune <input type="checkbox"/>		Hematol. <input type="checkbox"/>		Outras <input type="checkbox"/>							
Especifique:																									
Medicamentos: (na época)																									
Imobilização, Cirurgia ou Internação										Não <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/>		Motivo:						Duração:							
Câncer										Não <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/>		Qual:						Quimioterapia: (até três meses): Não <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/>		Duração:					
Traumas de MMII:				Não <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/>		Infecção: (3 meses anteriores) Não <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/>				Especifique:						Tromboflebite (3 meses anteriores) Não <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/>									
Viagem longa: (no mês anterior)				Não <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/>		Veículo:						Duração:													
Anticoncepcional ou repos. hormonal (na época)										Não <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/>		Qual:						Tempo de estímulo:							
Gestação no período: (Pós parto até o 3° mês)				Não <input type="checkbox"/>		1° trim. <input type="checkbox"/>		2° trim. <input type="checkbox"/>		3° trim. <input type="checkbox"/>		Pós Parto <input type="checkbox"/>		Parto: Vaginal <input type="checkbox"/>		Cesária <input type="checkbox"/>		Estimulo hormonal: Não <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/>							
EXAME FÍSICO																									
Circunferência abdominal:																									
Avaliação da presença de síndrome pós trombótica (Apenas Pacientes com TVP em MMII)																									
Membros inferiores (medidas em cm)										Escala de Villalta															
		Direito		Esquerdo		Intensidade		Nenhum (0 pontos)		Discreto (1 pontos)		Moderado (2 pontos)		Grave (3 pontos)											
Coxa (10 cm acima do joelho)						Sintomas		Dor		<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>											
Panturilha (10 cm abaixo prega post. joelho)								Cãibra		<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>											
Tornozelo (acima do maléolo medial)								Peso		<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>											
Úlcera venosa		Ausente <input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>				Parestesia (Formigamento)		<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>											
		<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>				Prurido (Coceira)		<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>											
Diagnóstico SPT										Sinais															
Total de pontos: (escala de Villalta)																									
Ausente <input type="checkbox"/>		Discreta <input type="checkbox"/>		Moderada <input type="checkbox"/>		Grave <input type="checkbox"/>		Edema pré-tibial												<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>	
Até 4 pts		5 a 9 pts		10 a 14 pts		≥15 pts ou úlcera		Endurecimento (Da pele)												<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>	
								Hiperpigmentação												<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>	
Meias de compressão										Não <input type="checkbox"/>		Sim <input type="checkbox"/>		Ectasia venosa (Varizes)		<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>					
Tratamentos: (Outros)										<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>							
OBSERVAÇÕES										DATA DO USG:															

ANEXO 3 – DADOS INCUCYTE®**TABELA 3A - PROLIFERAÇÃO**

TEMPO (HORAS)	CEFCS CN N=7	CEFCS TVP N=4	VALOR DE P
6	1.0 (1.0 – 1.2)	1.0 (1.0 – 1.0)	0.29
18	1.7 (1.3 – 1.7)	1.3 (1.3 – 1.6)	0.39
30	2.2 (1.9 – 2.5)	2.1 (1.7 – 2.3)	0.58
42	2.6 (2.0 – 3.0)	2.3 (2.0 – 2.8)	0.71
54	2.8 (2.2 – 3.5)	2.6 (2.1 – 3.1)	0.58
66	2.8 (2.2 – 3.8)	2.6 (2.2 – 3.3)	0.71
78	2.8 (2.3 – 3.8)	2.7 (2.2 – 3.3)	0.84
90	2.8 (2.2 – 3.8)	2.7 (2.2 – 3.3)	0.84

*Teste Mann Whitney – Dados expressos em Mediana e Interquartil

TABELA 3B - MIGRAÇÃO

Tempo (horas)	CEFCs CN N=10	CEFCs TVP N=4	Valor de p
6	39.8 (31.5 – 51.7)	27.6 (23.8 – 33.0)	0.05
12	61.2 (53.3 – 79.4)	45.7 (32.3 – 60.2)	0.13
18	82.4 (71.8 – 92.1)	66.4 (43.9 – 81.3)	0.13
24	90.1 (82.6 -95.9)	84.0 (55.8 – 91.9)	0.41
48	94.0 (90.2 – 98.1)	95.2 (83.9 – 97.5)	0.91
72	94.2 (91.8 – 98.3)	94.4 (88.3 – 98.6)	0.96

*Teste Mann Whitney – Dados expressos em Mediana e Interquartil

TABELA 3C - APOPTOSE

Tempo (horas)	CEFCs CN N=8	CEFCs TVP N=4	Valor de p	CEFCs CN + TNF N=8	CEFCs TVP + TNF N=4	Valor de p
6	1.1 (1.1 – 1.7)	1.5 (0.9 – 2.3.)	0.9	1.2 (1.1 – 1.7)	1.6 (1.0 – 2.5)	0.5
12	1.3 (1.2 -2.7)	1.8 (1.1 – 2.7)	0.9	1.5 (1.2 – 3.2)	2.0 (1.3 – 2.9)	0.8
24	1.7 (1.2 – 3.8)	2.5 (2.0 – 3.8)	0.2	1.7 (1.2 – 3.8)	2.7 7(2.1 – 3.5)	0.3
48	2.2 (1.3 – 4.2)	2.2 (1.7 – 4.0)	0.8	1.9 (1.1 – 3.4)	2.2 (1.7 – 3.5)	0.6

*Teste Mann Whitney – Dados expressos em Mediana e Interquartil