



**TATIANA MARY SAKAMOTO**

**AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES ADESIVAS  
E INFLAMATÓRIAS DAS CÉLULAS  
ENDOTELIAIS PROGENITORAS  
CIRCULANTES DE PACIENTES COM ANEMIA  
FALCIFORME**

**CAMPINAS**

**2013**





UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS

TATIANA MARY SAKAMOTO

**AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES ADESIVAS E  
INFLAMATÓRIAS DAS CÉLULAS ENDOTELIAIS  
PROGENITORAS CIRCULANTES DE PACIENTES  
COM ANEMIA FALCIFORME**

**Orientador: Dr. Fernando Ferreira Costa**

**Coorientadora: Dr<sup>a</sup>. Nicola Amanda Conran Zorzetto**

*Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós  
Graduação em Fisiopatologia Médica da Faculdade de  
Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas para  
obtenção do título de Doutor em Ciências Médicas.*

**CAMPINAS**

**2013**



FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR  
MARISTELLA SOARES DOS SANTOS – CRB8/8402  
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS  
UNICAMP

Sa29a Sakamoto, Tatiana Mary, 1979-  
Avaliação das propriedades adesivas e inflamatórias  
das células endoteliais progenitoras circulantes de  
pacientes com anemia falciforme / Tatiana Mary  
Sakamoto. -- Campinas, SP : [s.n.], 2013.

Orientador : Fernando Ferreira Costa.  
Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de  
Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Células endoteliais. 2. Anemia falciforme. 3.  
Adesão Celular. 4. Moléculas de adesão celular. 5.  
Citocinas. I. Costa, Fernando Ferreira, 1950-. II.  
Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de  
Ciências Médicas. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

**Título em inglês:** Evaluation of adhesive and inflammatory properties in blood  
outgrowth endothelial cells from patients with sickle cell anemia.

**Palavras-chave em inglês:**

Endothelial cells  
Anemia, Sickle cell  
Cell adhesion  
Cell adhesion molecules  
Cytokines

**Área de concentração:** Fisiopatologia Médica

**Titulação:** Doutora em Ciências

**Banca examinadora:**

Fernando Ferreira Costa [Orientador]  
Sandra Fátima Menosi Gualandro  
Rodolfo Delfini Cançado  
Erich Vinicius de Paula  
Cristina Pontes Vicente

**Data da defesa:** 07-02-2013

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



---

## BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE DOUTORADO

TATIANA MARY SAKAMOTO

---

---

Orientador (a) PROF(A). DR(A). FERNANDO FERREIRA COSTA

---

---

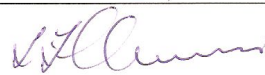
### MEMBROS:

---

1. PROF(A). DR(A). FERNANDO FERREIRA COSTA



2. PROF(A). DR(A). SANDRA FÁTIMA MENOSI GUALANDRO



3. PROF(A). DR(A). RODOLFO DELFINI CANÇADO



4. PROF(A).DR(A). ERICH VINICIUS DE PAULA



5. PROF(A).DR(A). CRISTINA PONTES VICENTE



---

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

---

Data: 07 de fevereiro de 2013

---



*Aos meus amados pais Paulo e Mariko e ao  
meu irmão Luciano pelo incentivo e confiança  
que nortearam a construção da minha vida  
pessoal e profissional.*



## AGRADECIMENTOS

---

A Deus pela sabedoria que me foi concedida a realizar este estudo.

Ao prof. Dr. Fernando Ferreira Costa pelos ensinamentos, paciência e confiança. Obrigada pela oportunidade de me permitir fazer parte do seu grupo de pesquisa, que muito contribuiu para o meu crescimento profissional.

A todos os participantes da pesquisa, em especial, aos pacientes que foram selecionados para a cultura de células.

A Dra. Nicola Conran por ter me aceito como sua aluna e pela coorientação importantíssima para a concretização deste estudo.

À Dra Margareth por gentilmente ceder o protocolo de BOEC e sempre estar à disposição a me atender com valiosas sugestões.

Aos colegas do laboratório do Hospital Universitário da UFMS que consentiram e apoiaram a realização do doutorado em Campinas.

Aos funcionários do Ambulatório de Hematologia do Hemocentro da UNICAMP, do Ambulatório de Transfusão, do laboratório de Hematologia e do laboratório de Marcadores Celulares, pela recepção, coleta e processamento das amostras dos participantes desta pesquisa.

À Carol, Renata e Adriana por terem me ensinado cultura de células. Agora faço parte desse mundo!

À Dulcinéia, Carol, Regiane e Andrey pela paciência e disponibilidade em me ajudar com as técnicas de Biologia Molecular.

À Ana Leda, Irene e Janine pela citometria de fluxo e às conversas descontraídas.

Ao Dr Aderson e Marcos André por terem viabilizado as amostras do HEMOPE.

À Venina, Vanessa Garrido e Flávia Pallis pelo apoio e amizade em todas as dificuldade e conquistas deste trabalho!

A todos do laboratório de Biologia Molecular que direta ou indiretamente fizeram parte da minha trajetória até aqui: Andréia, Flávia Lopes, Lediana, Marília, Flávia Costa, Kléber, Camila, Daiana, Angélica, Diana, Carol Ayumi, Lena, Simone, Dilmara, Taís, Ana Flávia, Vanessa Bernusso, Ucha, Ana Luiza, Ana Flávia, Fabíola, Karla Ferro, Carla, Emília, Patrícia, Cíntia, Sheley, Liciane, Telma, Fernanda e Gabriela.



Às minhas queridas amigas e conselheiras: Aline, Scheila, Carol Maciel, Giselle, Maína e Juliana, que de perto ou distantes não me desampararam em momento algum.

Ao CNPq, FAPESP e CAPES pelo apoio financeiro.



*"Deus nos fez perfeitos e não escolhe os capacitados,  
capacita os escolhidos. Fazer ou não fazer algo, só  
depende de nossa vontade e perseverança."*

*Albert Einstein*



## RESUMO

O endotélio tem participação importante na fisiopatologia da anemia falciforme (AF), por sofrer ativação e disfunção endotelial decorrente da hemólise intravascular e da inflamação crônica e por interagir com as hemácias, leucócitos e plaquetas no processo vaso-oclusivo. As células endoteliais, uma vez ativadas, induzem a via de sinalização inflamatória levando ao aumento da produção de mediadores inflamatórios e de expressão das moléculas de adesão. As células endoteliais progenitoras circulantes ou *Blood outgrowth endothelial cells* (BOECs) são isoladas a partir do sangue periférico de adultos, possuem alta capacidade proliferativa e fenótipo estável ao longo da cultura *in vitro* e diversos estudos têm utilizado-as como fonte de células no processo de regeneração vascular, biomaterial na terapia gênica, modelo de estudo fisiopatológico de doença vascular. Este trabalho teve como objetivo padronizar a cultura de BOEC com o intuito de servir como modelo de estudo *in vitro* sobre a função endotelial na AF, avaliar as propriedades adesivas e inflamatórias dessas células endoteliais de pacientes com anemia falciforme e comparando essas propriedades com as de indivíduos saudáveis (controles). As culturas de BOECs foram estabelecidas para pacientes com anemia falciforme (AF, N=11) e indivíduos saudáveis (Con, N=5). Os resultados de ensaio de adesão celular estática mostraram que as hemácias normais do grupo controle apresentaram uma adesão significativamente maior nas BOECs de pacientes com AF. Entre as BOECs de controle e de pacientes com AF não foram detectadas por citometria de fluxo diferenças significativas de expressão das moléculas de adesão VCAM-1, CD36, Selectinas P e E, integrina  $\alpha v \beta 3$  e Lu/BCAM, mas as BOECs AF demonstraram ser pró-inflamatórias, pois níveis significativamente elevados de IL-8 foram determinados por ELISA nos sobrenadantes das BOECs AF comparados aos sobrenadantes de BOECs Con. Pelo método de PCR array foram analisados a expressão de



84 genes endoteliais e dez genes foram identificados como significativamente subexpressos (↓) ou superexpressos (↑) nas BOECs de paciente AF em relação às BOECs de controle, *CCL2* (↓), *FAS* (↑), *PTGIS* (↓), *SELE* (↓), *SOD1* (↑), *TIMPI* (↑), *VWF* (↓), *IL6* (↑), *IL11* (↑), *PECAM* (↓), mas essas diferenças não explicam as propriedades adesivas e inflamatórias encontradas alteradas nas BOECs AF. Este estudo confirmou a possibilidade de se estabelecer culturas de BOECs de pacientes com anemia falciforme e de indivíduos saudáveis. Os resultados deste estudo mostram pela primeira vez na literatura que as células endoteliais de pacientes com anemia falciforme possam ter propriedades adesivas e inflamatórias anormais mesmo fora do ambiente da circulação do paciente com AF onde existe vaso-oclusão e inflamação crônica. Diante dos dados obtidos, as BOECs demonstraram ser um bom modelo de estudo *in vitro* de AF e que abrem uma nova perspectiva para contribuir no estudo de novas terapêuticas e na fisiopatologia da anemia falciforme.



## ABSTRACT

The endothelium has an important role in sickle cell anemia (SCA), undergoing endothelial activation and dysfunction as a result of intravascular hemolysis and chronic inflammation and interacting with red cells, leukocytes and platelets during the vaso-occlusive process. The endothelial cells, once activated, induce the inflammatory signaling pathway, leading to an increase in the production of inflammatory mediators and adhesion molecule expression. Blood outgrowth endothelial cells (BOECs) are isolated from adult peripheral blood and have a high proliferative capacity and a stable phenotype during *in vitro* culture. These cells have been used in diverse studies as a source for cells used in vascular regeneration, as biomaterial in gene therapy and as a pathophysiological vascular disease study model. This study aimed to establish the culture of BOEC for use as an *in vitro* study model for endothelial function in sickle cell anemia. The cultures were employed to evaluate the adhesive and inflammatory properties of these endothelial cells in sickle cell anemia patients by comparing these properties to those of healthy individuals. BOEC cultures were established for sickle cell anemia patients (SCA, N=11) and for healthy individuals (Con, N=5). The results of the static cell adhesion assay demonstrated that normal red cells of control group presented a significantly higher adhesion of the BOECs of sickle cell anemia patients. For control BOECs and patients with sickle cell anemia, flow cytometry did not detect significant differences in the expressions of adhesion molecules VCAM-1, CD36, P and E Selectins, integrin  $\alpha v \beta 3$  and BCAM/Lu, but sickle cell anemia BOECs were found to be pro-inflammatory as a significant level of IL-8 production was found in the supernatants of sickle cell anemia BOECs compared to Con BOECs (as determined by ELISA). By PCR array method, 84 endothelial genes were analysed and ten were identified as significantly downregulated ( $\downarrow$ ) or upregulated ( $\uparrow$ ) in BOECs of sickle cell anemia patients in relation to control BOECs, *CCL2* ( $\downarrow$ ), *FAS* ( $\uparrow$ ), *PTGIS* ( $\downarrow$ ), *SELE* ( $\downarrow$ ), *SOD1* ( $\uparrow$ ), *TIMP1* ( $\uparrow$ ), *VWF* ( $\downarrow$ ), *IL6* ( $\uparrow$ ), *IL11* ( $\uparrow$ ), *PECAM* ( $\downarrow$ ). These differences in gene expression do not explain the altered adhesive and inflammatory properties found in SCA BOECs. This study confirms the possibility of establishing BOEC cultures from patients with sickle cell anemia and from healthy individuals. The results of this study demonstrate, for the first time in the literature, that endothelial cells of sickle cell disease patients may have atypical adhesive and inflammatory properties even outside the



circulation of patients. BOECs were found to be a good model for the *in vitro* study of sickle cell disease and open new perspectives to contribute to the study of new therapeutic methods and the pathophysiology of sickle cell anemia.



## LISTA DE ABREVIATURAS

---

AF- Anemia falciforme

APC- Aloficocianina

BAC - Beta actina

BOEC- *Blood Outgrowth Endothelial Cells*

BSA- Soro albumina bovina

CCL-2- Proteína quimioatraente de monócitos

CCL-5- Proteína quimioatraente de leucócitos

cDNA- Ácido desoxirribonucleico complementar

CEC- Célula endotelial circulante madura

CEP- Célula endotelial progenitora

Con- Indivíduos-controle

DMSO- Dimetil sulfóxido

EBM-2- *Endothelial Basal Media*

EDTA- Ácido etilenodiamino tetra-acético

ELISA- Enzima imuno ensaio

eNOS- Óxido nítrico sintase endothelial

ET-1- Endotelina-1

FGF- Fator de crescimento de fibroblasto

FITC- Isotiocianato de Fluoresceína

FN- Fibronectina

FT- Fator tecidual

FvW- Fator de von Willebrand

GAPDH - Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase

G-CSF- Fator estimulador de colônia de granulócitos

GM-CSF- Fator estimulante de crescimento de colônias de macrófago-granulócitos

HBSS- *Hamk's Balanced Salt Solutions*

HMG-CoA- Hidroximetilglutaril-Coenzima A

HbS- Hemoglobina S

hEGF- Fator de crescimento epidermal

HU- Hidroxiurea



ICAM- Molécula de adesão intercelular  
IL- Interleucina  
KDR- Receptor de tirosina quinase  
LDL- Lipoproteína de baixa densidade  
Lu/BCAM- *Lutheran*/Molécula de adesão celular basal  
M-CSF- Fator estimulador de colônia de macrófago  
MEC - Matriz extracelular  
MIF- Média de intensidade de fluorescência  
MMP- Metaloproteinase  
NFκB- Fator nuclear kappa B  
NO- Óxido nítrico  
PBS - Salina tamponada fosfatada  
PCR- Reação de polimerase em cadeia  
PE – Ficoeritrina  
PECAM- Molécula de adesão de célula endotelial e plaqueta  
PIGF- Fator de crescimento placentário  
PerCP- Proteína clorofila peridina  
R3IgF- Fator de crescimento de insulina  
RNA- Ácido ribonucleico  
RPLP0- Proteína ribossomal P0  
ROS- Espécies reativas de oxigênio  
SDF-1- Fator derivado de célula estromal-1  
SFB- Soro fetal bovino  
Sinv- Sinvastatina  
SS- Paciente com anemia falciforme sem uso de hidroxiureia  
SSHU- Paciente com anemia falciforme em uso de hidroxiureia  
SSTrf- Paciente com anemia falciforme em transfusão sanguínea regular  
TNF- Fator de necrose tumoral  
VCAM- Molécula de adesão vascular  
VEGF- Fator de crescimento endotelial vascular  
VEGFR-2- Fator de crescimento endotelial vascular, receptor 2



## LISTA DE TABELAS

---

|                                                                                                                                                                                                                                                    |     |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| <b>Tabela 1.</b> Características e dados hematológicos de controles e de pacientes com anemia falciforme, cujas amostras foram utilizadas nos ensaios de adesão celular. ....                                                                      | 64  |
| <b>Tabela 2.</b> Sequência dos <i>primers</i> utilizados, tamanho do fragmento amplificado e concentração ótima para amplificação dos genes a serem validados. ....                                                                                | 78  |
| <b>Tabela 3.</b> Características e dados hematológicos e sucesso das culturas de BOEC de indivíduos-controle e de pacientes com anemia falciforme. ....                                                                                            | 86  |
| <b>Tabela 4.</b> Número de CECs/ $\mu$ L e CEPs/ $\mu$ L nos controles e pacientes com anemia falciforme. ....                                                                                                                                     | 90  |
| <b>Tabela 5.</b> Expressão de moléculas de adesão na superfície das BOECs (% de células expressando). ....                                                                                                                                         | 99  |
| <b>Tabela 6.</b> Expressão de moléculas de adesão de superfície das BOECs (média de intensidade de fluorescência). ....                                                                                                                            | 100 |
| <b>Tabela 7.</b> Sumário de genes identificados como significativamente alterados nas BOECs de pacientes com anemia falciforme em relação às BOECs de indivíduos-controle em estado basal, detectados por PCR <i>array</i> . ....                  | 109 |
| <b>Tabela 8.</b> Sumário de genes identificados como significativamente alterados nas BOECs de pacientes com anemia falciforme em relação às BOECs de indivíduos-controle após estímulo com TNF- $\alpha$ , detectados por PCR <i>array</i> . .... | 110 |



## LISTA DE FIGURAS

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figura 1. Fisiopatologia da anemia falciforme.</b> A mutação no gene da globina $\beta$ leva a formação da HbS que desoxigenada causa alterações celulares e manifestações clínicas. N: neutrófilos, He: hemácias, EC: células endoteliais, ISQ: isquemia (Adaptado, Steinberg, 2006). .....                                                                                                                                                                        | 45 |
| <b>Figura 2. Mobilização, recrutamento e diferenciação de células progenitoras, derivadas da medula óssea em células endoteliais maduras.</b> CEP: célula endotelial progenitora; MMP-9: metaloproteinase-9 da matriz, eNOS: óxido nítrico sintase endotelial; VEGF: fator de crescimento endotelial vascular (Adaptado Hristov & Weber, 2004). .....                                                                                                                  | 49 |
| <b>Figura 3. Interação de célula endotelial à hemácia por meio das moléculas de adesão</b> (Adaptado, Cartron, 2008). .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            | 52 |
| <b>Figura 4. Representação esquemática da cultura de BOEC.</b> .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   | 68 |
| <b>Figura 5. Esquema de tratamentos das células para a coleta dos sobrenadantes de culturas.</b> .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | 71 |
| <b>Figura 6. Corrida de eletroforese.</b> Frações ribossomais 28S e 18S das amostras de RNA de BOECs. ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             | 72 |
| <b>Figura 7. Esquema da placa <i>Human Endothelial Cell Biology RT<sup>2</sup> Profiler™ PCR Array</i> (Qiagen, Maryland, EUA).</b> .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | 74 |
| <b>Figura 8. Esquema do método de PCR <i>array</i> (Qiagen).</b> .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | 75 |
| <b>Figura 9. Análise de expressão por qPCR.</b> (A) Expressão de genes de uma placa de PCR <i>array</i> , representados no gráfico de amplificação. (B) Gráfico de dissociação é referente ao controle endógeno <i>GAPDH</i> . ....                                                                                                                                                                                                                                    | 80 |
| <b>Figura 10. Morfologia das células obtidas na cultura de BOECs.</b> (A) Células endoteliais progenitoras precoces, na forma de spindle-shaped, cultura de paciente com AF, 7 dias; (B) BOECs com a morfologia característica de cobblestone, cultura de paciente com AF, 21 dias; (C) BOEC de baixa proliferação, cultura de paciente com AF, 40 dias; (D) células mesenquimais, cultura de indivíduo-controle, 12 dias. Microscópio invertido, aumento de 10x. .... | 87 |
| <b>Figura 11. Caracterização das BOECs por citometria de fluxo.</b> As BOECs apresentaram positividade para múltiplos marcadores de células endoteliais (CD31, CD105, CD146, CD144, KDR). Os Dados apresentados são derivados da cultura de BOECs de um indivíduo-controle, em 45 dias de cultura, sendo representativo de onze pacientes AF e seis indivíduos-controle. ....                                                                                          | 88 |
| <b>Figura 12. Sequenciamento parcial do gene da globina <math>\beta</math> humana de amostra de DNA extraído de BOECs de controle e paciente com anemia falciforme em transfusão regular (SSTrf).</b> (A) Cromatograma para o alelo normal, em destaque, códon 6 (GAG). (B) Cromatograma para o alelo mutado (HbS), identificando a substituição do ácido glutâmico pela valina no códon 6 (GTG), resultado representativo de três BOECs SSTrf. ....                   | 89 |



- Figura 13. Adesão de hemácias de indivíduos-controle (Con) à BOEC Con (indivíduos-controle) e BOEC AF (pacientes com anemia falciforme).** BOECs sob (A) condição basal e (B) após estímulo de TNF- $\alpha$  (10ng/mL, 3h, 370C, 5% CO<sub>2</sub>). As hemácias foram incubadas por 30min à 37°C, em estufa a 5% CO<sub>2</sub>, em placas previamente cobertas com BOECs. Resultados expressos em média de % de células aderidas  $\pm$  erro padrão da média. \*\*\*P<0.01, comparado à adesão em BOEC Con. Teste de Mann-Whitney. .... 91
- Figura 14. Adesão de hemácias de indivíduos-controle (Con) à BOEC Con (indivíduos- controle); BOEC SS (pacientes AF sem uso de HU); BOEC SSHU (pacientes AF em tratamento com HU); BOEC SStrf (pacientes AF em transfusão).** BOECs sob (A) condição basal e (B) após estímulo de TNF- $\alpha$  (10ng/mL, 3h, 370C, 5% CO<sub>2</sub>). As hemácias foram incubadas por 30min à 37°C, em estufa a 5% CO<sub>2</sub>, em placas previamente cobertas com BOECs. Resultados expressos em média de % de células aderidas  $\pm$  erro padrão da média. \*\*P<0.01, \*P<0,05, comparado à adesão em BOEC Con. Teste de Kruskal Wallis seguido do Teste de Dunn. .... 92
- Figura 15. Adesão de hemácias de pacientes AF sem uso de hidroiureia (SS) à BOEC Con (indivíduos- controle) e BOEC AF (pacientes com anemia falciforme).** BOECs sob (A) condição basal e (B) após estímulo de TNF- $\alpha$  (10ng/mL, 3h, 370C, 5% CO<sub>2</sub>). As hemácias foram incubadas por 30min à 37°C, em estufa a 5% CO<sub>2</sub>, em placas previamente cobertas com BOECs. Resultados expressos em média de % de células aderidas  $\pm$  erro padrão da média. P>0,05. Teste de Mann-Whitney. .... 93
- Figura 16. Adesão de hemácias de pacientes AF sem uso de hidroxiureia (SS) à BOEC Con (indivíduos-controle); BOEC SS (pacientes AF sem uso de HU); BOEC SSHU (pacientes AF em tratamento com HU); BOEC SStrf (pacientes AF em transfusão).** BOECs sob (A) condição basal e (B) após estímulo de TNF- $\alpha$  (10ng/mL, 3h, 370C, CO<sub>2</sub>). Hemácias foram incubadas por 30min à 37°C, em estufa a 5% CO<sub>2</sub>, em placas previamente cobertas com BOECs. Resultados expressos em média de % de células aderidas  $\pm$  erro padrão da média. P>0,05. Teste de Kruskal Wallis seguido do Teste de Dunn. .... 94
- Figura 17. Adesão de hemácias de pacientes AF em uso de HU (SSHU) à BOEC Con (indivíduos-controle) e BOEC AF (pacientes com anemia falciforme).** BOECs sob (A) condição basal e (B) após estímulo de TNF- $\alpha$  (10ng/mL, 3h, 370C, 5% CO<sub>2</sub>). As hemácias foram incubadas por 30min à 37°C, em estufa a 5% CO<sub>2</sub>, em placas previamente cobertas com BOECs. Resultados expressos em média de % de células aderidas  $\pm$  erro padrão da média. P>0,05. Teste de Mann-Whitney. .... 95
- Figura 18. Adesão de hemácias de pacientes AF em uso de HU (SSHU) à BOEC Con (indivíduos-controle); BOEC SS (pacientes AF sem uso de HU); BOEC SSHU (pacientes AF em tratamento com HU); BOEC SStrf (pacientes AF em transfusão).** BOECs sob (A) condição basal e (B) após estímulo de TNF- $\alpha$  (10ng/mL, 3h, 370C, CO<sub>2</sub>). Hemácias foram incubadas por 30min à 37°C, em estufa a 5% CO<sub>2</sub>, em placas previamente cobertas com BOECs. Resultados expressos em média de % de células aderidas  $\pm$  erro padrão da média. P>0,05. Teste de Kruskal Wallis seguido do Teste de Dunn. .... 96



- Figura 19. Adesão de hemácias de indivíduos-controle (Con), de pacientes AF sem HU (SS) e de pacientes AF em uso de HU (SSHU) em BOECs.** (A) BOECs de indivíduos-controle, condição basal; (B) BOECs de indivíduos-controle, após estímulo de TNF- $\alpha$ ; (C) BOECs de pacientes AF, condição basal; (D) BOECs de pacientes AF, após estímulo de TNF- $\alpha$ . As hemácias foram incubadas por 30min à 37°C, em estufa a 5% CO<sub>2</sub>, em placas previamente cobertas com BOECs. Resultados expressos em média de % de células aderidas  $\pm$  erro padrão da média. \*P<0,05, comparado à adesão de hemácias-controle. #P<0,05, comparado à adesão de hemácias SSHU. Teste de Kruskal Wallis seguido do Teste de Dunn. .... 97
- Figura 20.** (A) Níveis de IL-8 dos sobrenadantes de cultura de BOECs Con (indivíduos-controle, N=5) e AF (pacientes com anemia falciforme, N=9), em condição basal e após estímulo com TNF- $\alpha$ . (B) Níveis de IL-8 dos sobrenadantes de cultura de BOECs Con (N=5), SS (pacientes AF sem HU, N=3); SSHU (pacientes AF em uso de HU, N=3); SSTrf (pacientes AF em transfusão, N=3) em condição basal. \*P<0,05 comparado à BOEC Con basal; Teste de Mann-Whitney. <sup>o</sup>P<0,05 comparado à BOEC Con basal e ##P<0,01 comparado à BOEC AF basal; Teste de Wilcoxon. \*\*P<0,01 comparado à BOEC Con e #P<0,05 comparado à SSTrf; Teste de Kruskal Wallis seguido do Teste de Dunn. .... 102
- Figura 21. Níveis de mediadores inflamatórios nos sobrenadantes de culturas de indivíduos-controle (BOEC Con, N=5) e de pacientes com anemia falciforme (BOEC AF, N=9), na presença ou ausência de TNF- $\alpha$ (10ng/mL, 3h, 37°C, CO<sub>2</sub>).** (A) GM-CSF; (B) CCL-2; (C) IL-6; (D) CCL-5 e (E) ET-1. \*P<0,05 comparado à BOEC Con basal; ##P<0,01 comparado à BOEC AF basal. Teste de Wilcoxon. .... 103
- Figura 22. Níveis de CCL-5 e ET-1 dos sobrenadantes de cultura coletados após incubação do meio de cultura por 3h30 min, 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, tratamentos com sinvastatina (Sinv, 10 $\mu$ M, 3h e 30min, 37°C, 5%CO<sub>2</sub>) e/ou na presença de TNF- $\alpha$  (10ng/mL, 3h, 37°C, 5%CO<sub>2</sub>) nos sobrenadantes de cultura.** (A) CCL-5 de BOECs Con (indivíduos-controle); (B) CCL-5 de BOECs AF (pacientes com anemia falciforme); (C) ET-1 de BOEC Con; (D) ET-1 de BOEC AF. \*P<0,05 e \*\*P<0,01 comparado à condição basal das células;  $\otimes$ P<0,05 comparado à BOEC AF + TNF. Teste de Friedman seguido do Teste de Dunn. .... 105
- Figura 23. Níveis de CCL-2 e GM-CSF dos sobrenadantes de cultura coletados após: incubação do meio de cultura por 3h30 min, 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, tratamentos com sinvastatina (Sinv, 10 $\mu$ M, 3h e 30min, 37°C, 5%CO<sub>2</sub>) e/ou na presença de TNF- $\alpha$  (10ng/mL, 3h, 37°C, 5%CO<sub>2</sub>) nos sobrenadantes de cultura.** (A) MCP-1 de BOEC Con (indivíduos-controle); (B) MCP-1 de BOEC AF (pacientes com anemia falciforme); (C) GM-CSF de BOEC Con; (D) GM-CSF de BOEC AF. \*P<0,05 e \*\*P<0,01 comparado à condição basal das células. Teste de Friedman seguido do Teste de Dunn. .... 106



- Figura 24.** Níveis de IL-8 e IL-6 dos sobrenadantes de cultura coletados após: incubação do meio de cultura por 3h30 min, 37<sup>0</sup>C, 5% CO<sub>2</sub>, tratamentos com sinvastatina (Sinv, 10μM, 3h e 30min, 37<sup>0</sup>C, 5%CO<sub>2</sub>) e/ou na presença de TNF-α (10ng/mL, 3h, 37<sup>0</sup>C, 5%CO<sub>2</sub>) nos sobrenadantes de cultura. (A) IL-8 de BOEC Con (indivíduos-controle); (B) IL-8 de BOEC AF (pacientes com anemia falciforme); (C) GM-CSF de BOEC Con; (D) IL-6 de BOEC AF; (E) IL-6 de BOEC Con; (F) IL-8 de BOEC AF; (C) IL-6 de BOEC Con; (D) IL-6 de BOEC AF \*P<0,05 e \*\*P<0,01 comparado à condição basal das células. Teste de Friedman seguido do Teste de Dunn. .... 107
- Figura 25.** Gráfico de clusterização dos genes avaliados pelo PCR *array* de acordo com BOECs de indivíduos-controle (CON 1, CON 2, CON 3), pacientes AF sem uso de hidroxiureia (SS 1, SS 2, SS 3), pacientes AF em uso de hidroxiureia (SSHU 1, SSHU 2, SSHU 3), pacientes AF em transfusão regular (SSTrf 1, SSTrf 2, SSTrf 3). A cor vermelha denota maior expressão e a cor verde menor expressão gênica. .... 112
- Figura 26.** Gráfico de clusterização dos genes avaliados pelo PCR *array* de acordo com BOECs de indivíduos-controle (CON 1, CON 2, CON 3), pacientes AF sem uso de hidroxiureia (SS 1, SS 2, SS 3), pacientes AF em uso de hidroxiureia (SSHU 1, SSHU 2, SSHU 3), pacientes AF em transfusão regular (SSTrf 1, SSTrf 2, SSTrf 3) após tratamento com TNF-α (10ng/mL, 3h, 370C, 5%CO<sub>2</sub>). A cor vermelha denota maior expressão e a cor verde menor expressão gênica. .... 113
- Figura 27.** Perfil de expressão de genes endoteliais detectados por qPCR em BOECs: Con (indivíduos-controle, N=4), SS (pacientes AF sem HU, N=3), SSHU (pacientes AF com HU, N=3) e SSTrf (pacientes em transfusão regular, SSTrf, N=3). (A) *ICAM1*; (B) *IL6*; (C) *CCL5*; (D) *TIMP1*; (E) *FVW*; (F) *FAS*. \*P<0,05 comparado à BOEC Con. Teste Kruskal Wallis, seguido do Teste de Dunn. .... 115
- Figura 28.** Perfil de expressão de genes endoteliais detectados por qPCR em BOECs: Con (indivíduos-controle, N=3), SS (pacientes AF sem HU, N=3), SSHU (pacientes AF com HU, N=3) e SSTrf (pacientes em transfusão regular, N=3) após tratamento com TNF-α (10ng/mL, 3h, 370C, 5%CO<sub>2</sub>). (A) *ICAM1*; (B) *IL6*; (C) *CCL5*; (D) *TIMP1*; (E) *FVW*; (F) *FAS*. \*P<0,05 comparado à BOEC Con. Teste Kruskal Wallis, seguido do Teste de Dunn. .... 116



# SUMÁRIO

---

|                                                                                 |       |
|---------------------------------------------------------------------------------|-------|
| <b>AGRADECIMENTOS</b> .....                                                     | xi    |
| <b>RESUMO</b> .....                                                             | xvii  |
| <b>ABSTRACT</b> .....                                                           | xxi   |
| <b>LISTA DE ABREVIATURAS</b> .....                                              | xxv   |
| <b>LISTA DE TABELAS</b> .....                                                   | xxix  |
| <b>LISTA DE FIGURAS</b> .....                                                   | xxxi  |
| <b>SUMÁRIO</b> .....                                                            | xxxix |
| <b>1. INTRODUÇÃO</b> .....                                                      | 43    |
| 1.1 Anemia Falciforme .....                                                     | 43    |
| 1.2 Endotélio .....                                                             | 46    |
| 1.2.1 Células endoteliais circulantes .....                                     | 47    |
| 1.2.2 Células endoteliais progenitoras .....                                    | 50    |
| 1.3 Participação do endotélio na fisiopatologia da anemia falciforme .....      | 50    |
| 1.3.1 Interações das hemácias às células endoteliais na anemia falciforme ..... | 51    |
| 1.3.2 Endotélio e inflamação na anemia falciforme .....                         | 53    |
| 1.4 Tratamento da anemia falciforme .....                                       | 54    |
| 1.4.1 Hidroxiureia .....                                                        | 54    |
| 1.4.2 Terapêutica transfusional .....                                           | 55    |
| 1.4.3 Estatinas .....                                                           | 55    |
| <b>2. OBJETIVOS</b> .....                                                       | 59    |
| 2.1 Objetivo geral .....                                                        | 59    |
| 2.2 Objetivos específicos .....                                                 | 59    |
| <b>3. CASUÍSTICA E MÉTODOS</b> .....                                            | 63    |
| 3.1 Pacientes e controles para cultura de células .....                         | 63    |
| 3.2 Pacientes e controles para o ensaio de adesão celular .....                 | 64    |
| 3.3 Aspectos éticos da pesquisa .....                                           | 65    |
| 3.4 Dados hematológicos .....                                                   | 65    |
| 3.5 Quantificação de células endoteliais circulantes .....                      | 65    |
| 3.6 Cultura de células BOECs .....                                              | 66    |
| 3.7 Caracterização das Células BOEC .....                                       | 69    |
| 3.8 Separação das células vermelhas .....                                       | 69    |
| 3.9 Ensaio de adesão estática de células vermelhas <i>in vitro</i> .....        | 69    |
| 3.10 Detecção da expressão proteica das moléculas de adesão nas BOECs .....     | 70    |
| 3.11 Dosagem de citocinas inflamatórias das BOECs .....                         | 71    |
| 3.12 Extração de RNA .....                                                      | 72    |

---



|                                                                                  |     |
|----------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 3.13 Síntese de cDNA para PCR <i>array</i> .....                                 | 73  |
| 3.14 PCR <i>array</i> .....                                                      | 73  |
| 3.15 Análise dos dados da PCR <i>array</i> .....                                 | 76  |
| 3.16 Validação da PCR <i>array</i> .....                                         | 76  |
| 3.16.1 Síntese de cDNA para PCR quantitativa em tempo real .....                 | 76  |
| 3.16.2 Desenho dos <i>primers</i> para PCR quantitativa em tempo real .....      | 76  |
| 3.16.3 Concentração dos <i>primers</i> .....                                     | 77  |
| 3.16.4 Eficiência da reação .....                                                | 78  |
| 3.16.5 PCR quantitativa em tempo real (qPCR) .....                               | 79  |
| 3.16.6 Análise dos dados de PCR em tempo real .....                              | 80  |
| 3.17 Análise Estatística .....                                                   | 81  |
| <b>4. RESULTADOS</b> .....                                                       | 85  |
| 4.1 Estabelecimento da cultura de BOEC .....                                     | 85  |
| 4.2 Quantificação das células endoteliais circulantes .....                      | 90  |
| 4.3 Ensaio <i>in vitro</i> de adesão celular estática .....                      | 90  |
| 4.4.1 Adesão de hemácias de indivíduos-controle às BOECs .....                   | 91  |
| 4.4.2 Adesão de hemácias de pacientes SS .....                                   | 93  |
| 4.4.3 Adesão de hemácias de pacientes SSHU .....                                 | 95  |
| 4.4.4 Adesão de hemácias de controles e pacientes AF .....                       | 96  |
| 4.5 Avaliação da expressão das moléculas de adesão na superfície das BOECs ..... | 98  |
| 4.6 Dosagem de mediadores inflamatórios .....                                    | 101 |
| 4.7 Expressão de genes relacionados ao sistema endotelial .....                  | 108 |
| <b>5. DISCUSSÃO</b> .....                                                        | 119 |
| <b>6. CONCLUSÃO</b> .....                                                        | 129 |
| <b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....                                       | 133 |
| <b>8. ANEXO</b> .....                                                            | 149 |
| 8.1 Anexo 1 - Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa da FCM/UNICAMP .....        | 151 |
| <b>9. APÊNDICE</b> .....                                                         | 155 |
| 9.1 Apêndice 1 .....                                                             | 155 |
| 9.2 Apêndice 2 .....                                                             | 158 |
| 9.3 Apêndice 3 .....                                                             | 161 |
| 9.4 Apêndice 4 .....                                                             | 162 |
| 9.5 Apêndice 5 .....                                                             | 166 |
| 9.6 Apêndice 6 .....                                                             | 167 |



# ***INTRODUÇÃO***



## 1. INTRODUÇÃO

Desde o início do século XIX, há casos descritos na literatura sobre uma doença hereditária que afeta as articulações e ossos e que levam a crises de dores em jovens e crianças da África. Herrick, em 1910, foi o primeiro a relatar que essa doença seria consequência de uma anormalidade no formato dos eritrócitos, usando o termo “forma de foice” para descrever a peculiar aparência dessas hemácias.

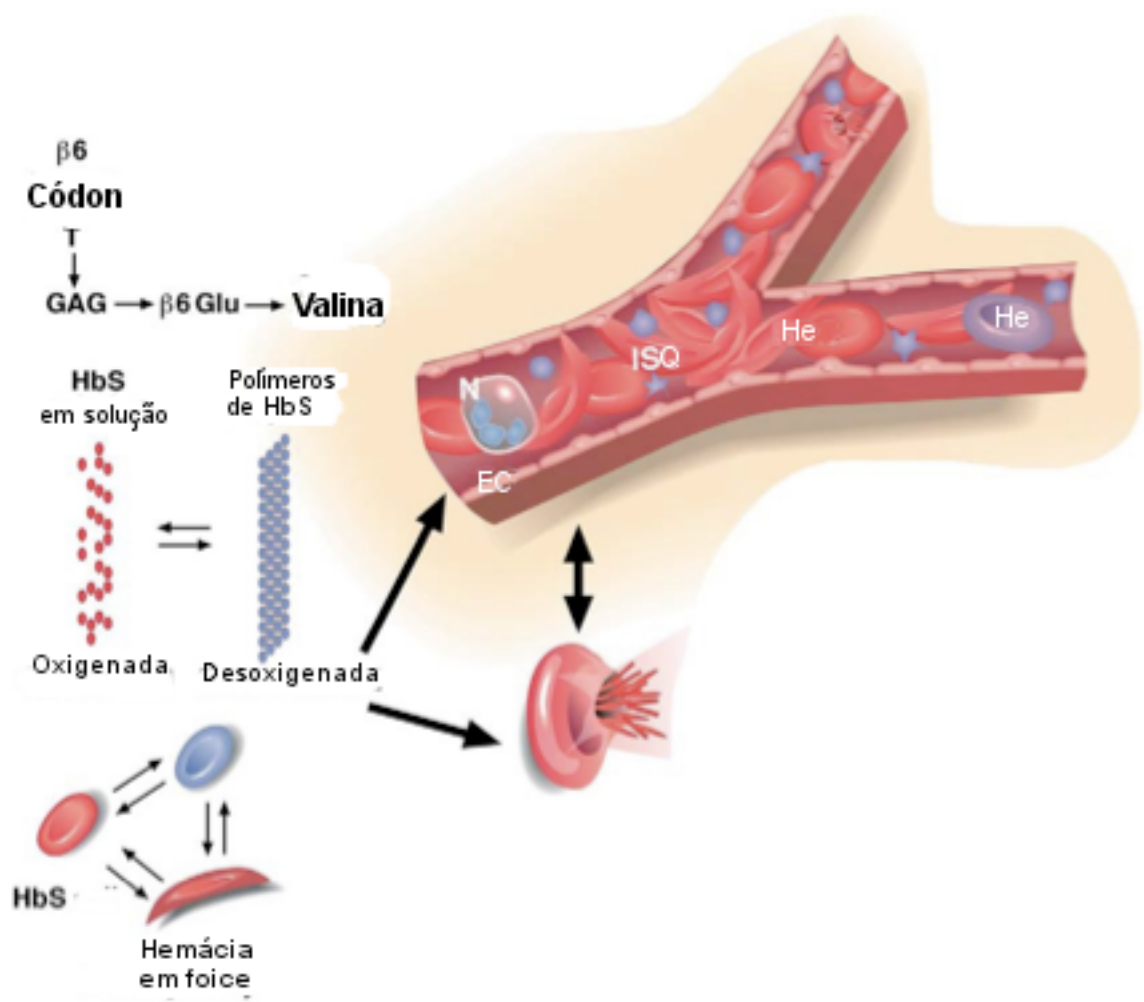
A anemia falciforme (AF) originou-se na África. Foi trazida às Américas pela imigração forçada dos escravos e atualmente é encontrada em toda a Europa e em grandes regiões da Ásia. No Brasil, a prevalência da AF é variável, sendo mais frequente na região nordeste, onde a proporção de antepassados negros na população é maior (Cardoso e Guerreiro, 2006).

### 1.1 Anemia Falciforme

A anemia falciforme é causada pela homozigose para uma mutação de ponto, envolvendo a substituição do nucleotídeo Adenina pela Timina ( $GAG \rightarrow GTG$ ), no códon 6 do gene da globina  $\beta$ , localizado no cromossomo 11, resultando na troca de aminoácido ácido glutâmico por uma valina na cadeia polipeptídica, com consequente produção de uma hemoglobina anômala, a hemoglobina S (HbS) (Steinberg, 1999). A HbS, quando desoxigenada, tem a capacidade de se polimerizar, resultando na alteração da forma do eritrócito, na acentuada redução de sua deformabilidade e encurtamento do tempo de vida média dos glóbulos vermelhos (Steinberg, 2006). A polimerização de desoxi-HbS depende de numerosas variáveis, como concentração de oxigênio, pH, concentração de HbS, temperatura, pressão, força iônica, e presença de hemoglobinas normais e anormais (Costa, 2004; Stuart e Nagel, 2004). As células rígidas, que assumem a forma de foice, são suscetíveis à hemólise e participam na oclusão vascular e lesão tecidual que representam os fenômenos principais dessa doença (Steinberg, 2006; Mack e Kato, 2006) (Figura 1).

Por várias décadas, a vaso-oclusão por hemácias falcizadas e rígidas era tida como a causa primordial da disfunção dos órgãos na AF. No entanto, evidências têm sido demonstradas que o processo vaso-oclusivo compreende mecanismos que envolvem interações entre diferentes tipos celulares como células falcizadas, reticulócitos, leucócitos, células endoteliais ativadas, plaquetas e proteínas plasmáticas, resultando em isquemia-

reperusão e na ativação e lesão endotelial (Hebbel, Schwartz e Mohandas, 1985; Conran e Costa, 2009). Mais recentemente, Reiter *et al.* (2002) demonstraram a redução da biodisponibilidade do óxido nítrico (NO) em consequência da hemólise intravascular na doença falciforme. Esta diminuição é ocasionada quando o NO é sequestrado pela hemoglobina livre no plasma, pelo aumento da atividade da enzima arginase e pelo consumo de NO pelas espécies reativas de oxigênio (Mack e Kato, 2006). A redução de NO facilita a vasoconstrição, aumenta a ativação plaquetária, e a adesão endotelial e leucocitária levando ao processo vaso-oclusivo (KATO et al., 2007). Assim, as células endoteliais desempenham papel importante na fisiopatologia da AF, quer no mecanismo de vaso-oclusão quer na função anormal do endotélio.



**Figura 1. Fisiopatologia da anemia falciforme.** A mutação no gene da globina  $\beta$  leva a formação da HbS que desoxigenada causa alterações celulares e manifestações clínicas. N: neutrófilos, He: hemácias, EC: células endoteliais, ISQ: isquemia (Adaptado, Steinberg, 2006).

## 1.2 Endotélio

O endotélio é constituído por dez trilhões de células endoteliais que revestem a parede vascular à semelhança de ladrilhos de uma parede. As células endoteliais exibem características fenotípicas que variam de acordo com o sistema de órgãos e tipo de vaso que revestem, podendo assim gerar diferentes respostas ao mesmo estímulo (Galley e Webster, 2004; Aird, 2007).

A estrutura e a integridade do endotélio formam uma barreira semipermeável que permite a passagem livre de moléculas e de células entre o sangue e o tecido. As células endoteliais exercem múltiplas funções como a de controle da coagulação sanguínea, manutenção do tônus vascular, participação na resposta inflamatória e na formação de novos vasos sanguíneos (Pobber, Min e Bradley, 2009; Galley e Webster, 2004).

As células endoteliais possuem a capacidade de produzir proteínas que participam diretamente na hemostasia. Essas proteínas incluem os fatores antitrombóticos como prostaciclina, trombomodulina, antitrombina, ativador de plasminogênio e heparina; e os fatores pró-coagulantes como fator de von Willebrand (FvW), tromboxano A<sub>2</sub>, fator V, fator ativador de plaquetas e inibidor de ativador de plasminogênio (Galley e Webster, 2004).

O endotélio regula o tônus vascular por meio da produção de fatores vasodilatadores como óxido nítrico e prostaciclina; e de fatores vasoconstritores como enzima conversora de angiotensinogênio, tromboxano A<sub>2</sub>, leucotrienos, radicais livres e endotelina-1 (Galley e Webster, 2004). O óxido nítrico, além do papel de vasodilatador é um inibidor de plaquetas, da adesão de leucócitos e da expressão do fator tecidual (Hebbel, Osarogiagbon e Kaul, 2004). A produção de endotelina-1 é modulada por citocinas inflamatórias, tem o papel de ser um potente fator vasoconstritor e de induzir a inflamação e a ativação endotelial (Kahaleh e Fan, 1997).

A superfície endotelial é provida de receptores que promovem a adesão de células sanguíneas, mecanismo importante na resposta imune. Esses receptores são moléculas de adesão classificadas em integrinas, superfamília de imunoglobulina e selectinas.

As integrinas são compostas por cadeias  $\alpha$  e  $\beta$ . A integrina mais importantemente expressa no endotélio é a  $\alpha_v\beta_3$  que serve como receptor para vitronectina, fibronectina, fibrinogênio, trombospondina, FvW e molécula de adesão intercelular-4 (ICAM-4) (Hynes,

1992). As moléculas de adesão que representam a superfamília de imunoglobulina e que estão presentes nas células endoteliais, são: molécula de adesão intercelular-1 (ICAM-1), que participa na adesão de leucócitos; molécula de adesão vascular-1 (VCAM-1), que é receptora para leucócitos e células vermelhas; e molécula de adesão de célula endotelial e plaqueta (PECAM), que pode ser importante na transmigração de neutrófilos (Abelda e Buck, 1990). As selectinas P e E são expressas no endotélio após estímulo de trombina e citocinas respectivamente e medeiam a adesão de leucócitos (Galley e Webster, 2004). A molécula CD36 é o único receptor glicosilado que é expresso na microvasculatura endotelial e se liga à trombospondina e ao colágeno (Sugihara *et al.*, 1992). O endotélio também expressa proteínas importantes na junção entre células endoteliais que são a ocludina e as caderinas. Essa adesão entre células endoteliais mantém a integridade e a barreira física do endotélio (Dejana, Corada e Lampugnani, 1995).

As células endoteliais têm participação importante na resposta inflamatória por produzirem uma variedade de mediadores inflamatórios como: as citocinas que incluem interleucinas (IL) 1 e 6 e o fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), os fatores de crescimentos (G-CSF, GM-CSF, TGF $\beta$ ), as quimiocinas (CCL-2, IL-8) e as proteínas de fase aguda como a proteína C reativa (Hebbel, Osarogiagbon e Kaul, 2004).

O fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) é um fator angiogênico, produzido por uma variedade de células que incluem as células endoteliais. Este fator participa no processo de angiogênese e contribui na resposta inflamatória (Cross *et al.*, 2003).

### **1.2.1 Células endoteliais circulantes**

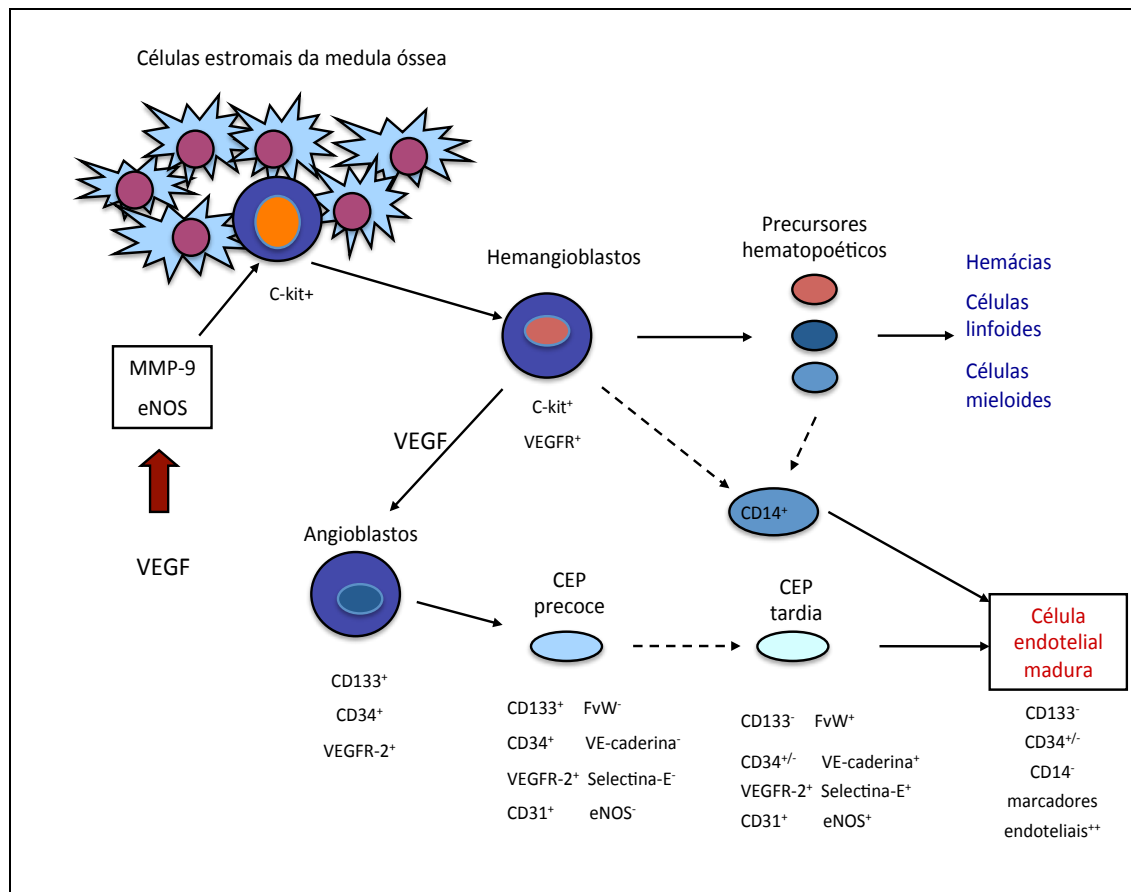
O endotélio é um órgão altamente responsivo a estímulos fisiopatológicos como fatores de crescimento, citocinas, lipoproteínas e produtos do estresse oxidativo. Uma vez lesado ou ativado, o endotélio tem as suas funções alteradas, podendo haver perda de sua integridade com liberação de células endoteliais para a circulação (Goon *et al.*, 2006).

As células endoteliais circulantes têm sido utilizadas como marcadores de dano vascular, sendo que micropartículas endoteliais são liberadas de células endoteliais apoptóticas e células endoteliais maduras (CECs) são destacadas do endotélio lesado para a

circulação. Em resposta à injúria vascular, mecanismos de reparos são desencadeados para o processo de reendotelização (Sabatier *et al.*, 2009).

O reparo endotelial no adulto ocorre por mecanismo de angiogênese, que implica na migração e proliferação local das células endoteliais maduras. Asahara *et al.* (1997) demonstraram que o recrutamento de células progenitoras da medula óssea e a sua diferenciação em células endoteliais maduras seria um mecanismo adicional de restabelecimento da integridade endotelial no adulto.

A mobilização de células endoteliais progenitoras (CEPs) da medula óssea para o sangue periférico pode ocorrer após isquemia tecidual ou injúria vascular e é um processo complexo. Inicia-se com a ativação de várias enzimas como a metaloproteinase-9 da matriz (MMP-9) que promove a transformação do ligante kit da membrana (mkitL) na forma solúvel do ligante kit (skitL). A skitL se liga ao seu receptor, presente em células progenitoras (cKit<sup>+</sup>), com consequente destacamento do nicho estromal da medula óssea para a zona vascular da medula óssea (Heissig *et al.*, 2002). As CEPs possivelmente originam-se de hemangioblastos que, em geral, são precursores de células vasculares e hematopoiéticas (Hristov e Weber, 2004; Urbich e Dimmeler, 2004). O fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) é um fator regulador que ativa a maturação dos hemangioblastos em angioblastos, que se diferenciarão em CEPs e, por fim, em células endoteliais maduras. O VEGF também ativa a MMP-9 que inicia o processo do recrutamento das células progenitoras para a circulação (Heissig *et al.*, 2002). As células mieloides (CD14<sup>+</sup>) possuem capacidade de se diferenciar em células endoteliais maduras, mas com potencial proliferativo limitado e não originam as CEPs (Hristov e Weber, 2004; Urbich e Dimmeler, 2004). (Figura 2). Outros fatores de crescimento angiogênicos como angiopoietina-1, fator de crescimento de fibroblasto (FGF), fator derivado de célula estromal-1 (SDF-1), fator de crescimento placentário (PIGF) e fator estimulador de colônia de granulócitos (G-CSF) também estão envolvidos na mobilização de CEPs (Miller-Kasprzak e Jagodzinski, 2007; Hristov e Weber, 2004).



**Figura 2. Mobilização, recrutamento e diferenciação de células progenitoras, derivadas da medula óssea em células endoteliais maduras.** CEP: célula endotelial progenitora; MMP-9: metaloproteinase-9 da matriz, eNOS: óxido nítrico sintase endotelial; VEGF: fator de crescimento endotelial vascular (Adaptado Hristov e Weber, 2004).

### 1.2.2 Células endoteliais progenitoras

As células endoteliais progenitoras circulantes ou como serão denominadas neste estudo \_ *Blood Outgrowth Endothelial Cells* (BOECs) \_ são células endoteliais com características de células maduras (Lin *et al.*, 2002). Na literatura essas células também são denominadas de *Outgrowth Endothelial Cells* (Medina *et al.*, 2010), *Endothelial Colony-Forming Cells* (Gulati *et al.*, 2003) e *late Outgrowth Endothelial Cells* (Hirschi, Ingram e Yoder, 2008). Tem sido proposto que essas células originam-se a partir das CEPs precoces, e Lin *et al.* (2000) demonstraram *in vitro* que as BOECs podem se originar diretamente a partir de angioblastos circulantes.

As BOECs, assim como as CEPs precoces, podem ser isoladas do sangue periférico por meio de cultura *in vitro*, e ambas células estão presentes em baixo número dentre as células mononucleares (0,1-0,01%) (Van Beem *et al.*, 2008). As CEPs precoces têm baixo potencial proliferativo, com morfologia denominada *spindle-shaped* (Lin *et al.*, 2000). As BOECs possuem alta capacidade proliferativa, com morfologia característica de células endoteliais (*cobblestone*) e fenótipo estável ao longo da cultura *in vitro*. (Van Beem *et al.*, 2008; Lin *et al.*, 2000; Gulati *et al.*, 2003; Fuchs *et al.*, 2006).

As células endoteliais progenitoras podem ser caracterizadas por marcadores endoteliais: CEPs precoces são CD133<sup>+</sup>/CD34<sup>+</sup>/VEGFR-2<sup>+</sup>/CD14<sup>-</sup> e não são capazes de formar vasos *in vitro*; BOECs são CD133<sup>-</sup>/CD34<sup>+/+</sup>/VEGFR-2<sup>+</sup>/CD31<sup>+</sup>/FvW<sup>+</sup>/VE-caderina<sup>+</sup>/eNOS<sup>+</sup>/CD105<sup>+</sup>/CD144<sup>+</sup>/CD146<sup>+</sup>, acetilam a lipoproteína de baixa densidade (LDL), ligam-se à aglutinina *Ulex europeus* e têm a capacidade angiogênica de formar vasos *in vitro* (Van Beem *et al.*, 2008; Lin *et al.*, 2000).

As BOECs têm sido utilizadas em diversos estudos como: fonte de células no processo de regeneração vascular (Critser e Yoder, 2010; Au *et al.*, 2008; Moubarik *et al.*, 2011), biomaterial na terapia gênica (Milbauer *et al.*, 2009; Lin *et al.*, 2002) , modelo no estudo fisiopatológico de doença vascular (Fernandez *et al.*, 2005), fonte de pesquisa na detecção de diferença na expressão de genes endoteliais (Milbauer *et al.*, 2008).

### 1.3 Participação do endotélio na fisiopatologia da anemia falciforme

Notavelmente, as funções e interações endoteliais estão alteradas na anemia falciforme. Evidências de adesão anormal entre o endotélio e os eritrócitos, plaquetas e

leucócitos, além da formação de citocinas inflamatórias e outros fatores adicionais indicam a participação importante das células endoteliais no mecanismo fisiopatológico da doença falciforme (Kasschau *et al.*, 1996; Solovey *et al.*, 1997).

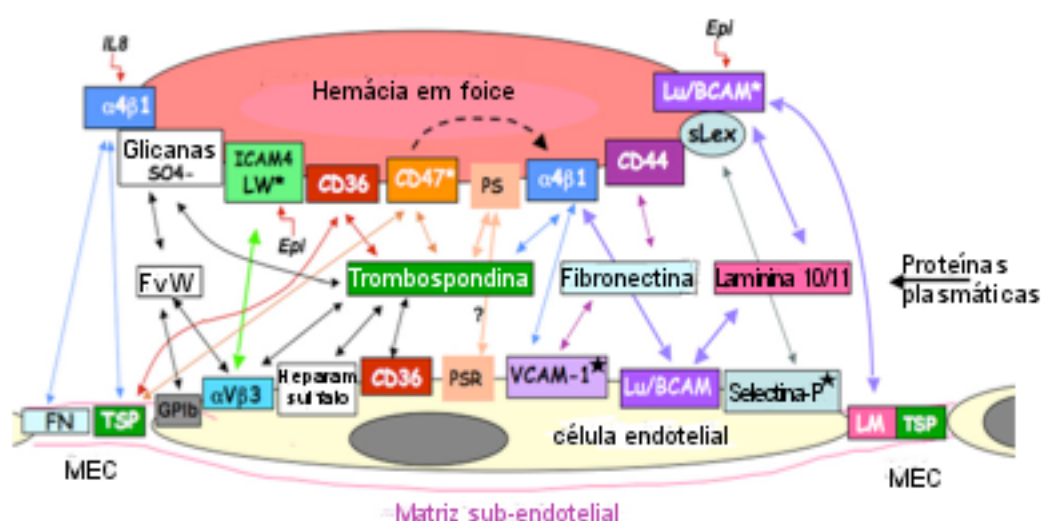
### **1.3.1 Interações das hemácias às células endoteliais na anemia falciforme**

Na AF, o processo de vaso-oclusão tem início com as interações entre células sanguíneas e endoteliais na microvasculatura, resultando na redução do fluxo sanguíneo e levando à polimerização da hemoglobina (Kaul, Fabry e Nagel, 1989). O papel das hemácias na vaso-oclusão tem sido estabelecido por estudos que mostram que as células vermelhas de pacientes com AF aderem mais facilmente às células endoteliais *in vitro* (Hebbel *et al.*, 1980; Space, 2000; Walmet *et al.*, 2003) e às proteína da matriz extracelular fibronectina e laminina (Kumar *et al.*, 1996; Hines *et al.*, 2003). Estudos *in vivo* (Kaul *et al.*, 1995; Kaul e Fabry, 2004) mostraram que a adesão das hemácias de camundongos transgênicos com AF à parede vascular ocorrem nas vênulas pós capilares, onde o fluxo sanguíneo e o diâmetro dos vasos são menores.

Ao contrário dos leucócitos que aderem ao endotélio por rolamento, firme adesão e transmigração, o mecanismo de adesão das hemácias não é bem definido (Kaul e Fabry, 2004). Vários mecanismos de adesão de hemácias na AF têm sido propostos (Hebbel, Osarogiagbon e Kaul, 2004, Stuart e Nagel, 2004) e são classificados de acordo com o tipo de interação molecular: receptores de hemácias, proteínas ligantes e receptores endoteliais. A integrina  $\alpha 4\beta 1$ , CD36, Lu/BCAM (*Lutheran*/Molécula de adesão celular basal) e ICAM-4 são receptores presentes nas hemácias e podem mediar a adesão interagindo respectivamente com VCAM-1, trombospondina, laminina e  $\alpha v\beta 3$  (Sugihara *et al.*, 1992; Swerlick *et al.*, 1993, Hines *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 2006). As proteínas ligantes incluem a trombospondina e FvW que são sintetizados pelo endotélio e pelas plaquetas e podem existir na forma solúvel no plasma bem como na superfície endotelial (Sugihara *et al.*, 1992; Wick *et al.*, 1987). A integrina  $\alpha v\beta 3$ , a selectina-P, VCAM-1, Lu/BCAM são alguns dos receptores endoteliais que medeiam a adesão das hemácias (Kaul *et al.*, 2000; Matsui *et al.*, 2001, Swerlick, *et al.*, 1993) (Figura 3).

A adesão anormal das hemácias rígidas e densas ao endotélio por esse conjunto de mecanismos resulta em injúria e ativação endotelial na AF (Kaul, Finnegan e Barabino,

2009). Sob hipóxia e estímulo inflamatório, as células endoteliais ativadas expressam um número maior de moléculas de adesão incluindo: CD 36, VCAM-1, integrina  $\alpha_v\beta_3$ , Selectina-P, Lu/BCAM e receptores para proteoglicanas e fosfatidilserina (Swerlick *et al.*, 1993; El Nemer *et al.*, 2008; Kaul *et al.*, 2000; Matsui *et al.*, 2001). Essa expressão pode, por sua vez, aumentar a adesão das hemácias e também das células brancas e de plaquetas ao endotélio.



**Figura 3. Interação de célula endotelial à hemácia por meio das moléculas de adesão** (Adaptado, Cartron, 2008).

### 1.3.2 Endotélio e inflamação na anemia falciforme

O mecanismo pelo qual o processo inflamatório nos vasos sanguíneos se inicia não está claro na AF, sabe-se que o endotélio sofre ativação pela adesão das células sanguíneas ao endotélio ou na presença de mediadores inflamatórios, tais como TNF- $\alpha$ , interleucina-1 $\beta$  (IL1- $\beta$ ) e proteína C reativa e eventos de isquemia-reperfusão, que geram espécies reativas ao oxigênio (ROS) que podem ativar o processo inflamatório no vaso (Aslan *et al.*, 2001).

A exposição de fosfatidilserina nas hemácias falcizadas pode ativar a cascata de coagulação e promover a inflamação via geração de fator tecidual (FT) e trombina (Yasin *et al.*, 2003). A produção do grupo heme e a diminuição da biodisponibilidade de óxido nítrico em consequência da hemólise, provocam efeitos diretos como dano e ativação das células endoteliais (Setty *et al.*, 2008; Rother *et al.*, 2005). A ativação endotelial é caracterizada pela ativação dos fatores NF $\kappa$ B (fator nuclear kappa B) (Belcher, 2005) e de indução à hipóxia (Kim *et al.*, 2006), seguida da expressão de mediadores inflamatórios como endotelina-1 (ET-1), FT e da inativação de óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) (Graido-Gonzalez *et al.*, 1998; Yasin *et al.*, 2003). O fator de transcrição NF $\kappa$ B está induzido no endotélio ativado e parece ter um papel importante na sinalização da via inflamatória, resultando na regulação exacerbada da expressão de moléculas de adesão e da produção de mediadores inflamatórios como citocinas, leucotrienos, fatores vasoconstritores, e fatores pró-coagulantes (Belcher, 2005). iante disso, o equilíbrio entre vasodilatação e vasoconstrição é rompido de tal modo que a vasoconstrição é favorecida. Em resposta a essa reação, os níveis de endotelina (vasoconstritor) estão elevados na anemia falciforme, ao passo que a produção de óxido nítrico (vasodilatador) está reduzida (Gladwin e Schechter, 2001).

Assim, o endotélio ativado produz citocinas e quimiocinas, incluindo IL-8, IL-1, fator ativador plaquetário, IL-6 e proteína quimiotática de monócito-1 (MCP-1) (Galley e Webster, 2004), o que resulta em altos níveis de moléculas circulantes inflamatórias, encontradas na AF como TNF- $\alpha$ , fator estimulador de colônia de granulócitos e macrófagos (GM-CSF), IL-8, IL-6, IL-1 $\beta$ , IL-3, fator estimulador de colônia de macrófago (M-CSF) (Lanaro *et al.*, 2009; Croizat 1994). Elevados níveis de moléculas de adesão como ICAM-1, VCAM-1 e selectina-E têm sido relatados no plasma de pacientes com AF (Blei, Francher e Guarini, 1994) e associados com aumentado número de células endoteliais

circulantes (CECs), sugerindo que o endotélio está ativado na AF (Solovey *et al.*, 1997; Strjibos *et al.*, 2009).

## **1.4 Tratamento da anemia falciforme**

### **1.4.1 Hidroxiureia**

A hidroxiurea (HU) é uma droga específica do ciclo celular utilizada no tratamento de doenças mieloproliferativas e da AF (Charache *et al.*, 1995). Na AF, a HU parece agir aumentando a Hb fetal, reduzindo a polimerização da HbS, a neutrofilia e algumas complicações associadas ao fenômeno vaso-oclusivo (Lassmann *et al.*, 1992; Yarbrow *et al.*, 1992). A habilidade da HU em aumentar os níveis de HbF varia entre os pacientes. Muitos deles apresentam melhora clínica antes de apresentar aumento significativo dos níveis de HbF (Halsey *et al.*, 2003; King, 2004). Investigações vêm demonstrando que a HU possa beneficiar os pacientes por outros mecanismos como a diminuição de moléculas de adesão na superfície das células (Okpala, 2006), redução da contagem de neutrófilos e eosinófilos (Charache *et al.*, 1995; Canali *et al.*, 2004), diminuição das propriedades adesivas em hemácias (Gambero *et al.*, 2007), redução das crises vaso-oclusivas e de dor (Charache *et al.*, 1995), diminuição da necessidade de transfusão, além de diminuir a mortalidade e morbidade desses pacientes (Steinberg *et al.*, 2003).

Rodriguez *et al.* (1998) relataram que a farmacodinâmica da HU possibilita que ela seja uma doadora de NO e também uma estimuladora da produção de NO devido ao tempo de meia vida de 6 horas. Gladwin *et al.* (2002) relataram que a terapia com HU promove a geração intravascular e intraeritrocitária de NO e é esse aumento o responsável por elevar os níveis de HbF. Cokic *et al.* (2003) mostraram que outros dois doadores de NO aumentam a expressão do gene da gama globina em progenitores eritróides. E isto está associado ao aumento dos níveis de guanosina monofosfato cíclica (GMPc), sugerindo a presença de uma via mediada por NO na indução do gene da gama globina, com conseqüente aumento na síntese de HbF.

### **1.4.2 Terapêutica transfusional**

Pacientes com anemia falciforme toleram bem a anemia crônica e necessitam de transfusões somente em circunstâncias especiais, como por exemplo crise de sequestro esplênico ou hepático, acidente vascular cerebral, preparação para cirurgia, gravidez, hipóxia com síndrome torácica aguda e priapismo (Costa, 2004; Steinberg, 1999).

Na indicação de regime transfusional na anemia falciforme, em geral, o objetivo deve ser manter o nível de HbS abaixo de 30% (Steinberg, 1999). A transfusão simples de concentrado de hemácias pode ser utilizada no caso de piora da anemia, que pode ocorrer especialmente durante o tratamento das crises álgicas por vaso-oclusão. Outras duas modalidades de transfusão feitas de forma eventual também são utilizadas: a exsanguíneotransfusão, ou troca sanguínea manual, em que o paciente é submetido a sangrias terapêuticas e transfusões sucessivas; e a eritrocitaférese, ou troca automatizada das hemácias, por meio de uma máquina de aférese que substitui apenas o componente eritrocitário do sangue mediante separação por centrifugação. Ambas podem ser utilizadas, principalmente quando o paciente apresenta complicações como acidente vascular cerebral e síndrome torácica aguda grave, em que há a necessidade de reduzir rapidamente os níveis de HbS. Os programas regulares de transfusão também são uma alternativa para os pacientes que não respondem a hidroxiureia, e são indicados na prevenção do acidente vascular cerebral em pacientes de alto risco, na manutenção dos pacientes após acidente vascular cerebral, na insuficiência cardíaca, entre várias indicações (Araújo, 2007).

### **1.4.3 Estatinas**

O estado inflamatório e a vasculopatia crônica, presentes na anemia falciforme, sugerem uma abordagem terapêutica anti-inflamatória.

As estatinas são o grupo de fármacos utilizados no tratamento das hiperlipidemias, por reduzirem os níveis de colesterol pela inibição da enzima hidroximetilglutaril-Coenzima A redutase (HMG-CoA redutase) (Vaughan *et al.*, 2009). As estatinas possuem outros efeitos que são conhecidos como pleiotrópicos e incluem ação reguladora na função endotelial, aumento da estabilidade de placas ateroscleróticas, diminuição do estresse oxidativo, da inflamação e da resposta trombogênica (Liao e Laufs, 2005), sugerindo benefício da utilização desse medicamento no tratamento da AF.

Estudos prévios afirmam que as estatinas poderiam restabelecer a função endotelial; em parte, pela diminuição dos níveis de colesterol e também pelo aumento de NO endotelial por estimulação e sub-regulação da enzima eNOS (Kureishi et al., 2000). Outros estudos demonstraram que as estatinas possuem propriedades anti-inflamatórias devido à capacidade de reduzirem o número de células inflamatórias em placas ateroscleróticas, em consequência da inibição da molécula de adesão ICAM-1. Adicionalmente, as estatinas atenuam a expressão de selectina-P e a adesão de leucócitos pelo aumento da produção de NO endotelial (Vaughan *et al.*, 2000; Diomedea *et al.*, 2001; Kimura *et al.*, 1997; Niwa *et al.*, 1996).

Trabalhos utilizando estatinas em AF têm sido realizados, Solovey *et al.* (2004) demonstraram que a lovastatina reduziu a expressão de fator tecidual em camundongos transgênicos para AF sujeitos à hipóxia e reperfusão. Um estudo piloto avaliou biomarcadores de disfunção endotelial em pacientes com AF, tratados com a sinvastatina, a qual provocou o aumento dos níveis de NO e reduziu os níveis de proteína C reativa e IL-6 (Hoppe *et al.*, 2011). Um estudo *in vitro*, do nosso grupo de pesquisa, com células endoteliais mostrou que a sinvastatina foi capaz de reduzir as propriedades adesivas de leucócitos de pacientes com AF (Canalli *et al.*, 2011).

Apesar da AF ser caracterizada pela falcização das hemácias, o endotélio vascular possui um papel importante na fisiopatologia dessa hemoglobinopatia; quer seja pelas interações entre células endoteliais e células sanguíneas no processo vaso-oclusivo quer pela disfunção endotelial causada pela diminuição da biodisponibilidade do NO, em consequência da hemólise intravascular e da inflamação crônica.

Desse modo, estabelecer a cultura de BOEC, com o intuito de servir como modelo de estudo *in vitro* sobre a função endotelial na AF e suas consequências como alterações nas propriedades adesivas e na inflamação, é pertinente para a melhor compreensão da fisiopatologia da anemia falciforme.

# ***OBJETIVOS***



## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo geral**

Estabelecer a cultura de BOECs como modelo de estudo *in vitro* de células endoteliais de pacientes com anemia falciforme.

### **2.2 Objetivos específicos**

- Comparar a proliferação e características morfológicas das BOECs de indivíduos saudáveis, dos pacientes com anemia falciforme;
- Comparar *in vitro* a adesão de hemácias às BOECs de indivíduos saudáveis, dos pacientes com anemia falciforme;
- Detectar a expressão das moléculas de adesão de BOECs de indivíduos saudáveis e de pacientes com anemia falciforme;
- Determinar os níveis de mediadores inflamatórios produzidos pelas BOECs de indivíduos saudáveis e de pacientes com anemia falciforme;
- Avaliar a expressão de genes importantes para a função endotelial das BOECs de indivíduos saudáveis e de pacientes com anemia falciforme por método que analisa a expressão de múltiplos genes (PCR *array*).



# ***CASUÍSTICA E MÉTODOS***



### 3. CASUÍSTICA E MÉTODOS

#### 3.1 Pacientes e controles para cultura de células

No período de outubro de 2010 a agosto de 2012, foram selecionados pacientes e indivíduos-controle para cultura de células endoteliais progenitoras circulantes (BOECs). A casuística da cultura constituiu-se de dois grupos de estudo: grupo de pacientes com anemia falciforme e grupo de controle, composto por pessoas saudáveis.

Os pacientes com anemia falciforme foram selecionados em seguimento regular ambulatorial, no Centro de Hematologia e Hemoterapia da UNICAMP, com o auxílio do médico responsável. Dois pacientes com anemia falciforme e um indivíduo saudável foram provenientes do Hemocentro de Pernambuco – HEMOPE.

Os pacientes com anemia falciforme (AF) tinham o diagnóstico por eletroforese de hemoglobina e cromatografia líquida de alta performance (Bio-Rad, Hercules, CA, EUA), com sequenciamento automático para confirmação da mutação, quando necessário, idade mínima de 18 anos e em fase estável da doença, com ausência de infecção ou processos inflamatórios agudos. Além disso, para constituir o grupo de pacientes com AF foram escolhidos aqueles que não faziam uso de hidroxiureia (SS), estavam em tratamento com hidroxiureia por pelo menos 3 meses (SSHU) ou em esquema de transfusão sanguínea regular (SSTrf).

Os indivíduos-controle (Con) foram recrutados dentre os alunos e funcionários do Centro de Hematologia e Hemoterapia da UNICAMP, com padrão eletroforético e índices hematológicos normais e idade mínima de 18 anos.

Os participantes com dislipidemia, *diabetes mellitus*, hipertensão arterial, doenças auto-imunes e tabagistas foram excluídos.

### 3.2 Pacientes e controles para o ensaio de adesão celular

No período de novembro de 2010 a outubro de 2012, pacientes com anemia falciforme e indivíduos saudáveis foram selecionados de acordo com os mesmos critérios utilizados para a cultura de células e na ausência de transfusão sanguínea prévia à coleta de amostra por 3 meses. A casuística para o ensaio de adesão foi constituída por 3 grupos: pacientes com anemia falciforme em uso de hidroxiureia por pelo menos 3 meses (SSHU), pacientes com anemia falciforme sem uso de hidroxiureia (SS) e indivíduos saudáveis como controle (Con) (Tabela 1).

**Tabela 1.** Características e dados hematológicos de controles e de pacientes com anemia falciforme, cujas amostras foram utilizadas nos ensaios de adesão celular.

| <b>Parâmetros</b>                                          | <b>Con<br/>N=25</b>  | <b>Pacientes SS<br/>N=21</b> | <b>Pacientes SSHU<br/>N=26</b> |
|------------------------------------------------------------|----------------------|------------------------------|--------------------------------|
| <b>Idade (anos)</b>                                        | 34,8 (25-58)         | 36,9 (16-51)                 | 41,6 (26-68)*                  |
| <b>Feminino/Masculino</b>                                  | 14/11                | 16/5                         | 13/13                          |
| <b>Hemoglobina (g/dL)</b>                                  | 15,1<br>(12,4-17,5)  | 7,8<br>(6,0-10,4)***         | 9,2<br>(6,5-11,8)***           |
| <b>Leucócitos (<math>\times 10^3 / \mu\text{L}</math>)</b> | 5,7<br>(4,3-7,6)     | 10,4<br>(5,4-19,6)***        | 6,5<br>(3,5-10,4)              |
| <b>Plaquetas (<math>\times 10^3 / \mu\text{L}</math>)</b>  | 272<br>(201-398)     | 437<br>(283-634)***          | 362<br>(159-862)               |
| <b>Reticulócitos (<math>\times 10^9 / \text{L}</math>)</b> | 69,2<br>(39,2-166,0) | 281,3<br>(153,1-425,1)***    | 190,7<br>(37,3-333,4)*         |

Con: indivíduos-controle; SS: pacientes AF sem uso de HU; SSHU: pacientes AF em tratamento com HU. Resultados expressos em média (mínima, máxima). \*P<0,05; \*\*\*P<0,001, quando comparado aos indivíduos-controle. Teste de Kruskal Wallis seguido do Teste de Dunn.

### 3.3 Aspectos éticos da pesquisa

Este projeto foi aprovado em 26/10/2010 pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, segundo o parecer nº 968/2010 (Anexo 1), conforme previsto na resolução número 196/96 do Conselho Nacional de Saúde. Todos os participantes do estudo assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido.

### 3.4 Dados hematológicos

Os hemogramas foram realizados em aparelho *Advia 120* (Siemens, Dublin, Irlanda) com contagem diferencial de leucócitos e contagem de reticulócitos, realizados automaticamente e confirmados de forma manual, em lâminas coradas por *Leishman* e azul de cresil brilhante, respectivamente (Tabela 1).

### 3.5 Quantificação de células endoteliais circulantes

A quantificação de células endoteliais circulantes maduras (CECs) e células endoteliais progenitoras (CEPs) foi realizada pelo método de citometria de fluxo, utilizando-se anticorpos monoclonais conjugados com os fluorocromos: isotiocianato de fluoresceína (FITC), ficoeritrina (PE), proteína clorofila peridina (PerCP) ou alofococianina (APC). Os anticorpos usados foram: anti-CD31-FITC, clone MBC 78.2 (Invitrogen, Camarillo, CA, EUA), anti-CD146-PE, clone 128018 (R&D Systems, Minneapolis, MN, EUA), anti-VEGF-R2/KDR-PE, clone 89106 (R&D Systems, Minneapolis, MN, EUA), anti-CD34-FITC, clone My10 (BD, San Jose, CA, EUA), anti-CD45-PerCP, clone 2D1 (BD, San Jose, CA, EUA), anti-CD133-APC, clone AC133 (Miltenyi Biotech, Auburn, CA, EUA).

O sangue total foi coletado em dois tubos contendo o anticoagulante ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) (BD vacutainer, San Jose, CA, EUA), sendo que o primeiro tubo foi submetido à realização do hemograma e o segundo, para a quantificação das células endoteliais. Para a marcação das células, foi utilizada uma concentração de  $5,0\text{--}10,0 \times 10^3$  leucócitos/ $\mu\text{L}$  de sangue total. Volumes de  $100\mu\text{L}$  do sangue total foram incubados por 20 minutos, a  $4^\circ\text{C}$ , no escuro, com  $5\mu\text{L}$  de cada anticorpo, conforme um painel de 4 cores:

- Tubo 1- Células sem marcação;

- Tubo 2- CD31-FITC/CD146-PE/CD45-PerCP/CD133-APC;
- Tubo 3- CD34-FITC/KDR-PE/CD45-PerCP/CD133-APC.

Após a incubação, os eritrócitos foram lisados com 2mL de solução *FACS lysing*, diluída a 1:10 (Becton Dickinson, San Jose, CA, EUA) e incubados novamente por 10 minutos. As células foram centrifugadas a 317g por 5 minutos, lavadas com solução de salina tamponada fosfatada/albumina de soro bovino (PBS/BSA) 2% (pH=7,4) e em seguida foi realizada a aquisição de 100.000 células (eventos) no citômetro de fluxo (FACS Calibur, Immunofluorometry systems, Mountain View, CA, EUA). A análise dos dados foi realizada no *software Infinicyt<sup>TM</sup>* (Salamanca, Espanha). As células foram consideradas como CECs, quando  $CD31^{+}/CD146^{+}/CD45^{dim}/CD133^{-}$  e como CEPs, quando  $CD34^{+}/KDR^{+}/CD45^{dim}/CD133^{+}$ .

O cálculo das CECs e CEPs foi realizado pela fórmula descrita a seguir (Körbling *et al.*, 2006):

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

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

### 3.6 Cultura de células BOECs

O estabelecimento da cultura de células BOECs foi baseado no protocolo de Lin *et al* (2000). Primeiramente foi feita a separação de células mononucleares. As amostras de sangue periférico (54mL) de pacientes e de indivíduos saudáveis foram coletadas em tubos contendo o anticoagulante heparina lítica (BD Vacutainer, San Jose, CA, EUA) e processadas imediatamente após a coleta. As amostras foram diluídas a 1:2 em solução de PBS com pH=7,4 e, em seguida, colocadas em gradiente de *Ficoll-Paque<sup>TM</sup> Plus 1.077* (GE Healthacare, Uppsala, Suécia) por 30 minutos a 317g em temperatura ambiente. A camada de células mononucleares formada na interface (*buffy coat*) foi coletada e as células foram lavadas em PBS e, posteriormente, em meio EBM-2 (*Endothelial Basal Media*) (Lonza, Walkersville, MD, EUA) (Figura 4).

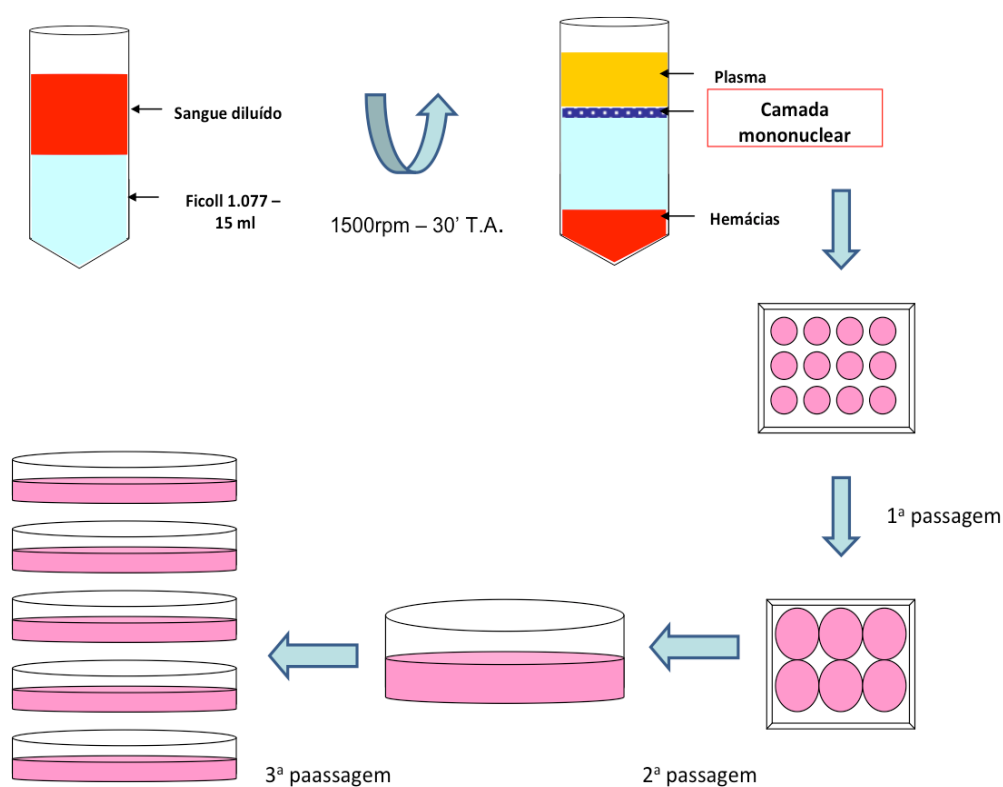
As células obtidas foram cultivadas numa concentração de aproximadamente  $7 \times 10^6$  células, num volume de 1,5mL de meio de cultura, em placa de 12 poços, revestidas

previamente com colágeno tipo I de cauda de rato (50µg/mL) (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, EUA). O meio de cultura utilizado constituiu-se de meio EBM-2, suplementado com fatores do *kit* EGM<sup>TM</sup>-2 *Single Quots* (*Endothelial Growth Media*) (Lonza, Walkersville, MD, EUA): 10% de soro fetal bovino (SFB), fator de crescimento de fibroblastos humanos (hFGF), VEGF, hidrocortisona, fator de crescimento de insulina (R3IgF), fator de crescimento ligado à heparina (hBGF), fator de crescimento epidermal (hEGF), ácido ascórbico, heparina, gentamicina e anfotericina. A este meio de cultura também foram acrescentados 100U/mL de penicilina, 100U/mL de estreptomicina e L-glutamina, fornecidos pela *Gibco* (Life Technologies, EUA). As células foram incubadas em estufa a 37<sup>0</sup>C e 5% de CO<sub>2</sub>. O meio de cultura foi trocado diariamente nos primeiros sete dias e depois, três vezes na semana.

De acordo com o protocolo, na primeira semana da cultura, esperou-se o aparecimento de células progenitoras endoteliais (CEPs), com o formato de *spindle-shaped* que deviam desaparecer ao longo da cultura; as primeiras colônias de BOECs poderiam surgir em torno de 9 a 21 dias de cultura, com a morfologia característica de células endoteliais maduras, denominada de *cobblestone* (Lin *et al.*, 2000).

Com o surgimento das colônias de BOECs, esperou-se que estas atingissem a confluência para realizar a primeira passagem, que foi possível ser feita aproximadamente 30 dias após o início da cultura, quando as células foram passadas da placa de 12 poços (TPP, Suécia) para uma placa de 6 poços (TPP, Suécia); a segunda passagem da placa de 6 poços para uma placa de 100mm (Sarstedt, Newton, NC, EUA) ocorreu em torno de 35 dias após o início da cultura; e a terceira passagem de uma placa de 100mm para 5 placas de 100mm foi feita aproximadamente aos 40 dias de cultura. A passagem foi realizada por meio de tripsinização: o meio de cultura foi retirado, as células aderidas foram lavadas duas vezes com PBS e foi adicionada a tripsina/EDTA 0,25% (Gibco Invitrogen, Grand Island, NY, EUA), num volume que variou de acordo com o tamanho da placa. A seguir, as células com a tripsina foram levadas à estufa por 3 a 4 minutos para serem desgrudadas, posteriormente, adicionou-se sobre elas o meio EBM-2, suplementado com 5% de SFB para a inibição da tripsina. Desta forma, as células foram coletadas e passadas para uma placa maior.

Na terceira passagem, obteve-se uma quantidade suficiente de células para fazer a caracterização destas por citometria de fluxo. As células identificadas como BOECs foram expandidas e congeladas em solução composta por 90% de SFB e 10% de dimetil sulfóxido (DMSO) (Merck, Darmstadt, Alemanha). Para o congelamento de células, fez-se a tripsinização; a cada  $1 \times 10^6$  de células foi adicionado 1mL da solução de SFB/DMSO. As células foram armazenadas em caçapa de congelamento com isopropanol, no freezer, a  $-80^{\circ}\text{C}$ , por 24 horas e, posteriormente, transferidas para o tanque de nitrogênio líquido até o momento da sua utilização nos experimentos.



**Figura 4. Representação esquemática da cultura de BOEC.**

### 3.7 Caracterização das Células BOEC

A caracterização foi feita por identificação da morfologia *cobblestone*, em microscópio invertido (Olympus IX81), com o auxílio do *software* de imagem *Olympus Cell^F* e por detecção de marcadores endoteliais presentes na superfície celular pela técnica de citometria de fluxo, utilizando anticorpos específicos conjugados a fluorocromos: anti-CD31-FITC, clone MBC 78.2 (Invitrogen, Camarillo, CA, EUA), anti-CD144-PE, clone TEA 1/31 (Beckman Coulter, Marseille, França), anti-CD105-PE, clone SN6 (Caltag, Carlsbad, CA, EUA), anti-CD146-PE, clone 128018 (R&D Systems, Minneapolis, MN, EUA), anti-VEGF R2/KDR-PE, clone 89106 (R&D Systems, Minneapolis, MN, EUA), anti-CD34-FITC, clone My10 (BD, San Jose, CA, EUA), anti-CD45-PerCP, clone 2D1 (BD, San Jose, CA, EUA), anti-CD14-PE, clone TÜK4 (Dako, Glostrup, Dinamarca), anti-CD133-APC, clone AC133 (Miltenyi Biotech, Auburn, CA, EUA). Dez mil células foram adquiridas e a análise foi realizada no *software* *BD FACS DIVA 7.0* (San Jose, CA, EUA)

### 3.8 Separação das células vermelhas

As amostras de sangue periférico (4mL) foram coletadas em tubo com citrato de sódio (BD Vacutainer, San Jose, CA, EUA) e centrifugadas por 10 minutos a 500g para a remoção do plasma e da camada de leucócitos. A seguir, as células foram lavadas 3 vezes com PBS e centrifugadas a 700g, 600g e 480g respectivamente, sendo então ressuspensas com 1 ml de PBS para a contagem de células vermelhas, no contador automático *Coulter diff AcT Pak™* (Beckman Coulter, Fullerton, CA, EUA). A concentração final foi ajustada a  $2 \times 10^8$  células/mL com o meio de cultura *Hamk's Balanced Salt Solutions* (HBSS) (Gibco-Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA).

### 3.9 Ensaio de adesão estática de células vermelhas *in vitro*

O ensaio de adesão estática de células vermelhas foi realizado conforme descrito por Gambero *et al* (2007). Placas com 96 poços (Cellstar, Greiner bio-one) foram preparadas por *coating* individual nos poços, com 50µl do ligante desejado (BOEC de indivíduo-controle ou de paciente na concentração  $1,5 \times 10^4$  células/mL, até a confluência, 4<sup>a</sup> e 12<sup>a</sup> passagem), por 24 horas, a 37°C em estufa, 5% CO<sub>2</sub>. Este mesmo ensaio foi realizado em

condições de inflamação, quando as BOECs foram previamente estimuladas com TNF- $\alpha$  (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA), 10ng/mL, por 3 horas.

O meio de cultura presente na placa foi descartado e as hemácias de indivíduos-controle ou de pacientes ( $2,0 \times 10^8$  células/ml) foram adicionadas num volume de 50 $\mu$ l, em meio HBSS e incubadas com as BOECs de indivíduos-controle e de pacientes, durante 30 minutos (37°C em estufa, 5% CO<sub>2</sub>) para permitir a adesão. Após a incubação, as células não aderidas foram removidas gentilmente com três lavagens de 100 $\mu$ l com PBS. Cinquenta microlitros de meio HBSS foram adicionados a cada poço onde foi realizada a reação. Concentrações variadas, em porcentagem de 0, 5, 8, 10, 20, 50, 80 e 100 da suspensão original de células vermelhas ( $2 \times 10^8$  células/ml), foram adicionadas em outra placa de 96 poços para construir a curva padrão.

A cada poço (reação de adesão e curva padrão) foram adicionados 50 $\mu$ L da solução de revelação, o Drabkin (Sigma, St Louis, USA). Esse reagente tem a propriedade de lisar as células vermelhas e expor a hemoglobina presente nessas células. A hemoglobina foi oxidada em cianometahemoglobina e a intensidade de cor desse composto foi medido colorimetricamente no leitor de ELISA a 540nm (Multiscan MS, Labsystems, EUA). A aderência foi calculada por comparação da absorbância das amostras desconhecidas com a absorbância da curva padrão que apresenta concentrações celulares conhecidas.

### **3.10 Detecção da expressão proteica das moléculas de adesão nas BOECs**

A detecção da expressão proteica das moléculas de adesão presentes na superfície das BOECs foi feita pela técnica de citometria de fluxo, que consiste no reconhecimento de proteínas *in situ*, com o anticorpo conjugado a fluorocromo.

As moléculas de adesão avaliadas foram: ICAM-1 (CD54-PE, clone HA58 BD, San Jose, CA, EUA), VCAM-1 (CD106-FITC, clone 51-10C9, BD, San Jose, CA, EUA), CD36 (CD36-FITC, clone CB38, BD, San Jose, CA, EUA), Selectina-E (CD62E-PE, clone 68-5H11, BD, San Jose, CA, EUA), Selectina-P (CD62P-FITC, clone AK-4, BD, San Jose, CA, EUA), Lu/BCAM (CD239-FITC, clone BRIC221, Gene Tex, Irvine, CA, EUA) e integrina  $\alpha_v\beta_3$  (CD51/CD61-FITC, clone 23C6, BD, San Jose, CA, EUA).

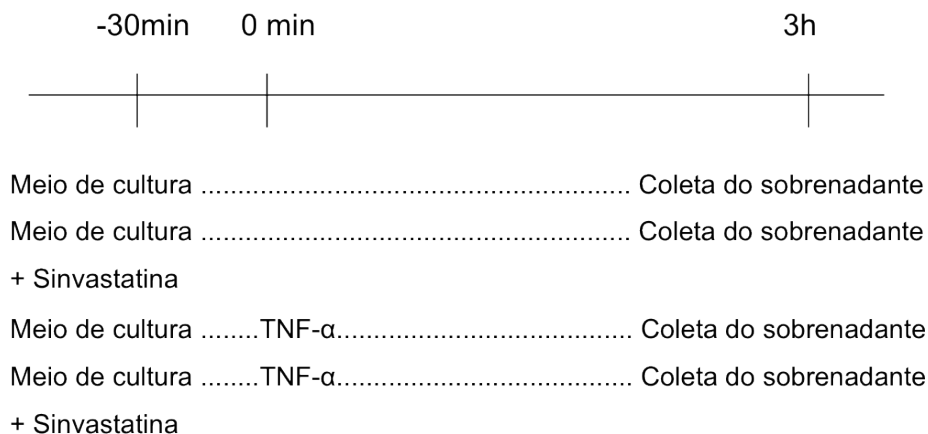
As BOECs (4<sup>a</sup> – 7<sup>a</sup> passagem) em condições basais ou estimuladas com TNF- $\alpha$  (10ng/mL, 3 horas) foram tripsinizadas e centrifugadas (317g /10 min); o sobrenadante foi

removido para a obtenção das células; as BOECs isoladas ( $5,0 \times 10^5$  células em 100µL por tubo) foram incubadas em concentração saturada de anticorpo monoclonal da molécula de adesão, conjugado com fluorocromos, por 30 minutos, a 4°C, na ausência de luz. As células foram lavadas com PBS e ressuspensas em 0,3ml de PBS para a aquisição de 10.000 células no citômetro de fluxo (FACS Calibur, Immunofluorometry systems, Mountain View, CA, EUA) e a análise foi realizada no *software BD FACS DIVA 7.0* (San Jose, CA, EUA).

Os resultados foram expressos em porcentagem de células que expressaram a molécula de adesão pesquisada em relação às células não marcadas usadas como controle negativo.

### 3.11 Dosagem de citocinas inflamatórias das BOECs

Os sobrenadantes das culturas de BOECs ( $1 \times 10^6$  células/mL, na 5ª passagem) foram coletados após incubação com ou sem estímulo inflamatório (TNF-α, 10ng/mL, 3 horas; R&D Systems, Minneapolis, MN, EUA) e na presença ou ausência de sinvastatina (10µM, 3 horas e 30 minutos, Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, EUA) (Figura 5), para a dosagem por meio de *kits* comerciais de *Enzyme linked immunoassay* (ELISA) de: IL-8 (BD, San Jose, CA, EUA), IL-6, CCL-5, GM-CSF, MCP-1 e endotelina-1 (Quantikine ELISA Kits, R&D Systems, Minneapolis, MN, EUA).



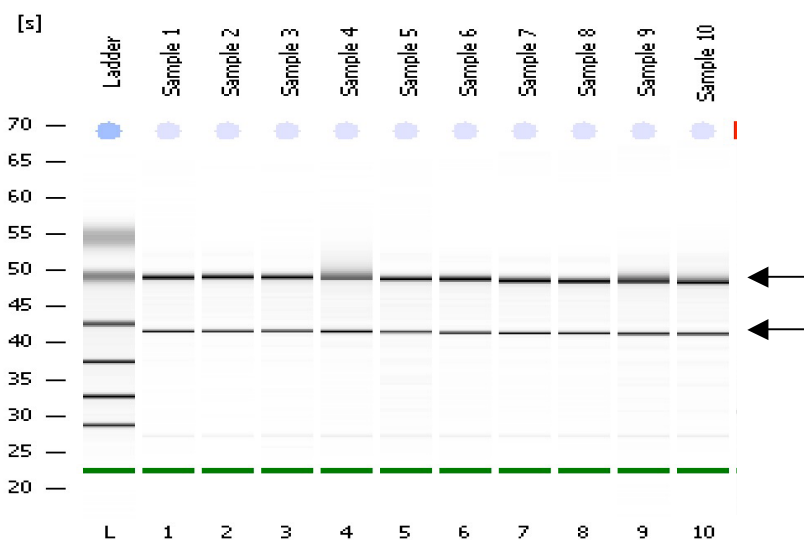
**Figura 5. Esquema de tratamentos das células para a coleta dos sobrenadantes de culturas.**

### 3.12 Extração de RNA

Na 6ª passagem, em condições basais ou estimuladas com TNF- $\alpha$  (10ng/mL, 3 horas), as BOECs foram tripsinizadas e centrifugadas (317g/10 min); o sobrenadante foi removido e ao *pellet* de células foi adicionado à solução de lise do *kit* comercial para a extração de ácido ribonucleico (RNA).

As amostras de RNA foram extraídas com *kit* comercial – *Rneasy* Mini ou Micro *kit* (Qiagen GmbH, Hilden, Alemanha) - segundo as instruções do fabricante. Optou-se pelo uso do *kit*, uma vez que a quantidade de células disponíveis não era abundante. Além disso, a pureza e a qualidade do RNA eram fundamentais para o sucesso da transcrição destas amostras.

O RNA foi quantificado por meio de leitura da densidade óptica no espectrofotômetro (Nanodrop Technologies, Inc., Rockland, DE, EUA), em comprimento de onda de 260 nm; a integridade da amostra foi verificada por meio de RNA 6000 Nano *kit* (Agilent Technologies, Waldbronn, Alemanha) e posterior leitura no equipamento *Agilent 2100 Bioanalyzer* (Agilent Technologies, Waldbronn, Alemanha). As amostras íntegras apresentaram duas subunidades ribossomais: 18S e 28S (Figura 6). Para a realização de *RT<sup>2</sup> Profiler PCR Arrays*, o número de integridade de RNA (NIR) dado pelo *Bioanalyzer* deve ser maior que 7. Após a confirmação da integridade, as amostras foram armazenadas em freezer a -80°C.



**Figura 6. Corrida de eletroforese.** Frações ribossomais 28S e 18S das amostras de RNA de BOECs.

### 3.13 Síntese de cDNA para PCR array

A síntese de ácido desoxirribonucleico complementar (cDNA) foi realizada a partir de aproximadamente 1µg de RNA das BOECs, por meio de *kit RT<sup>2</sup> First Strand* (Qiagen, Maryland, EUA) que é específico para a obtenção de cDNA a ser utilizado na reação de polimerase em cadeia (PCR) *array*. As amostras de cDNA foram armazenadas no freezer a -20°C até o momento do uso.

### 3.14 PCR array

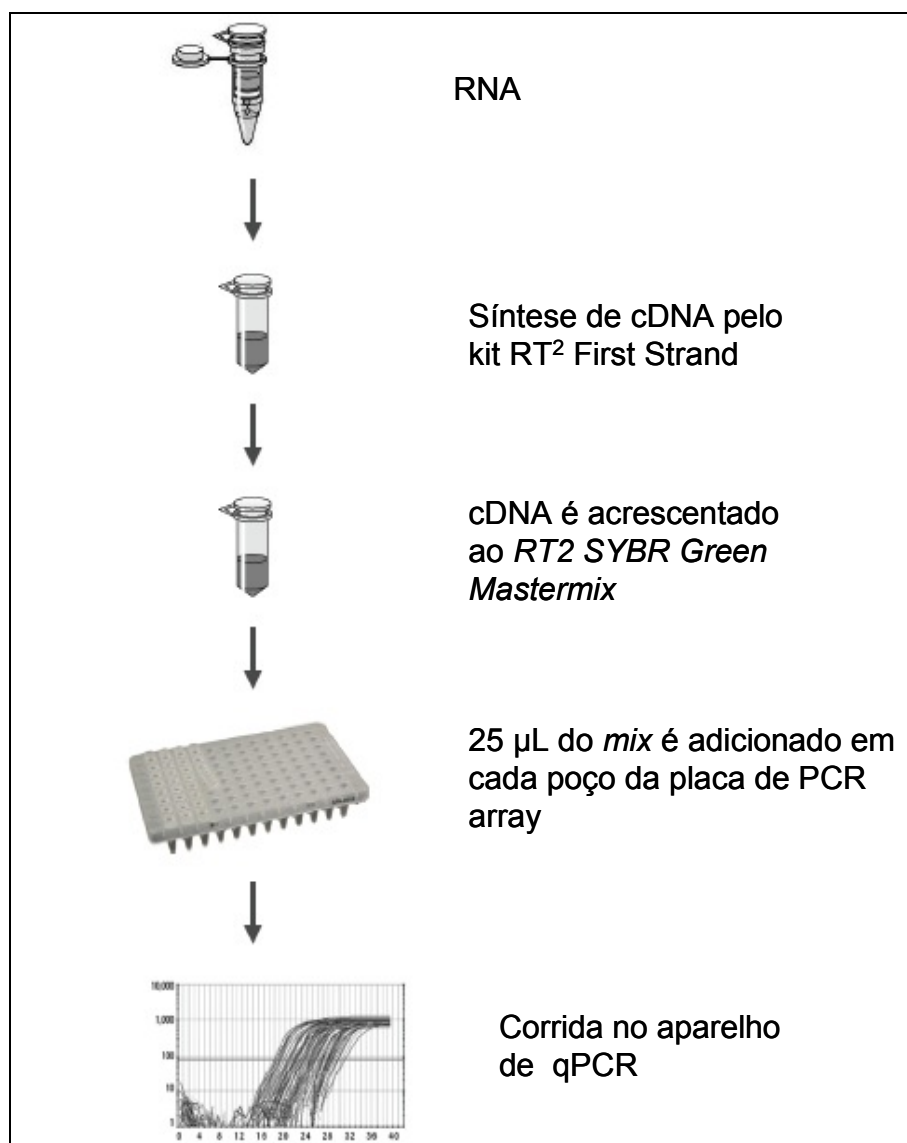
A *RT<sup>2</sup> profiler PCR array* (Qiagen, Maryland, EUA) é uma combinação de duas técnicas: a reação de polimerase em cadeia em tempo real (qPCR) e o *microarray*, que detectam vários genes simultaneamente. Para garantir o sucesso da realização da PCR *array*, foi utilizado o *RT<sup>2</sup> SYBR Green Mastermix* do próprio fabricante da placa do PCR *array* (Qiagen, Maryland, EUA). O reagente de detecção utilizado na PCR *array* foi o *SYBR Green*, o qual é um corante constituído por uma molécula que emite maior quantidade de sinal fluorescente ao intercalar com DNA de dupla fita.

Para este estudo, foi selecionada a placa *Human Endothelial Cell Biology RT<sup>2</sup> Profiler™ PCR Array* (Qiagen, Maryland, EUA). Procedeu-se a técnica de acordo com as instruções do fabricante. Foram utilizados 1µg de cDNA e *SYBR Green* 1x para o volume final de 25µL por poço de cada placa. A placa de PCR *array* permitiu analisar simultaneamente 84 genes expressos em células endoteliais, os quais estão relacionados à inflamação, adesão celular, vasodilatação e vasoconstrição, coagulação, ativação plaquetária, angiogênese e apoptose. Nesta placa estavam inclusos 5 genes endógenos, um controle de DNA genômico, três controles de transcrição reversa e três controles positivos da PCR (Figura 7). Cada placa de PCR *array* detecta a expressão gênica de uma amostra a ser analisada.

|              |               |              |              |              |               |              |                |               |                 |               |              |
|--------------|---------------|--------------|--------------|--------------|---------------|--------------|----------------|---------------|-----------------|---------------|--------------|
| ACE<br>A01   | ADAM17<br>A02 | AGT<br>A03   | AGTR1<br>A04 | ALOX5<br>A05 | ANGPT1<br>A06 | ANXA5<br>A07 | APOE<br>A08    | BAX<br>A09    | BCL2<br>A10     | BCL2L1<br>A11 | CALCA<br>A12 |
| CASP1<br>B01 | CASP3<br>B02  | CAV1<br>B03  | CCL2<br>B04  | CCL5<br>B05  | CDH5<br>B06   | CFLAR<br>B07 | COL18A1<br>B08 | CX3CL1<br>B09 | EDN1<br>B10     | EDN2<br>B11   | EDNRA<br>B12 |
| ENG<br>C01   | F2R<br>C02    | F3<br>C03    | FAS<br>C04   | FASLG<br>C05 | FGF1<br>C06   | FGF2<br>C07  | FLT1<br>C08    | FN1<br>C09    | HIF1A<br>C10    | HMOX1<br>C11  | ICAM1<br>C12 |
| IL11<br>D01  | IL1B<br>D02   | IL3<br>D03   | IL6<br>D04   | IL7<br>D05   | ITGA5<br>D06  | ITGAV<br>D07 | ITGB1<br>D08   | ITGB3<br>D09  | KDR<br>D10      | KIT<br>D11    | KLK3<br>D12  |
| MMP1<br>E01  | MMP2<br>E02   | MMP9<br>E03  | NOS3<br>E04  | NPPB<br>E05  | NPR1<br>E06   | OCLN<br>E07  | PDGFRA<br>E08  | PECAM1<br>E09 | PF4<br>E10      | PGF<br>E11    | PLAT<br>E12  |
| PLAU<br>F01  | PLG<br>F02    | PROCR<br>F03 | PTGIS<br>F04 | PTGS2<br>F05 | PTK2<br>F06   | SELE<br>F07  | SELL<br>F08    | SELPLG<br>F09 | SERPINE1<br>F10 | SOD1<br>F11   | SPHK1<br>F12 |
| TEK<br>G01   | TFPI<br>G02   | TGFB1<br>G03 | THBD<br>G04  | THBS1<br>G05 | TIMP1<br>G06  | TNF<br>G07   | TNFSF10<br>G08 | TYMP<br>G09   | VCAM1<br>G10    | VEGFA<br>G11  | VWF<br>G12   |
| ACTB<br>H01  | B2M<br>H02    | GAPDH<br>H03 | HPRT1<br>H04 | RPLP0<br>H05 | HGDC<br>H06   | RTC<br>H07   | RTC<br>H08     | RTC<br>H09    | PPC<br>H10      | PPC<br>H11    | PPC<br>H12   |

**Figura 7. Esquema da placa *Human Endothelial Cell Biology RT<sup>2</sup> Profiler™* PCR Array (Qiagen, Maryland, EUA).**

A detecção de expressão gênica por PCR *array* foi realizada no equipamento *StepOne Plus* (Applied Biosystems, EUA). O programa foi iniciado a 95°C/10 minutos, seguido de 40 ciclos: 95°C/15 segundos e 60°C/1 minuto. À medida que os produtos gerados pela PCR desnaturaram com o aumento de temperatura, o sinal de fluorescência do *SYBR Green* diminuiu. O gráfico resultante permitiu verificar se houve amplificação de um ou mais genes na PCR em tempo real, devido a diferenças de TM (temperatura de *melting*) entre os produtos de PCR gerados devido ao número e composição de bases de cada um. O esquema abaixo resume o método da PCR *array* (Figura 8).



**Figura 8. Esquema do método de PCR *array* (Qiagen).**

### 3.15 Análise dos dados da PCR array

Os dados gerados pela qPCR foram analisados no *software RT<sup>2</sup> profiler PCR array data analysis version 3.5* (Qiagen:<http://pcrdataanalysis.sabiosciences.com/pcr/arrayanalysis.php>). O programa de análise avaliou os dados, e a expressão gênica foi calculada em relação aos genes endógenos *GAPDH* (gliceraldeído-3-fostato desidrogenase) e *RPLP0* (proteína ribossomal P0).

O cálculo de expressão gênica foi realizado pelo *software* baseado na fórmula de  $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$  que resulta em valores em *fold change*, isto é, quantas vezes o gene do paciente foi mais ou menos expresso, quando comparado ao grupo controle, cujo *fold change* é igual a 1 (*RT<sup>2</sup> Profiler PCR array handbook*, 02/2012).

### 3.16 Validação da PCR array

Para a validação dos resultados obtidos da PCR array, foram selecionados alguns genes que estavam diferentemente expressos nas BOECs de pacientes AF em relação às BOECs Con (Tabela 1), e o método de qPCR foi utilizado para essa validação.

#### 3.16.1 Síntese de cDNA para PCR quantitativa em tempo real

As amostras de RNA (1µg) foram tratadas com *DNAaseI* (Fermentas -Thermo Scientific), por 30 minutos, a 37<sup>0</sup>C, para a remoção de qualquer DNA contaminante. A reação foi interrompida com a adição de EDTA e incubação a 65<sup>0</sup>C, por 10 minutos. Em seguida foram adicionados os reagentes: dNTPs (necessários para a formação da fita a ser sintetizada), oligo dT (que liga-se a cauda poli-A do RNA mensageiro, servindo de ancorador), e a transcriptase reversa (responsável pela síntese de cadeia de cDNA). A reação foi incubada por 60 minutos, a 42<sup>0</sup>C, temperatura ideal para a atividade da enzima. Logo em seguida, uma nova incubação foi realizada a 70<sup>0</sup>C, por 5 minutos, para a inativação da enzima transcriptase reversa.

#### 3.16.2 Desenho dos primers para PCR quantitativa em tempo real

As sequências do RNA mensageiro dos genes selecionados para a validação da PCR array foram obtidas do banco de dados *National Center for Biotechnology Information* ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)). Com o auxílio do *software Primer Express* (Invitrogen, Life

Technologies), os *primers* foram desenhados, sempre que possível, em éxons diferentes, com produto de amplificação entre 60 e 150pb e temperatura de anelamento de 60<sup>0</sup>C. Posteriormente as sequências selecionadas foram submetidas aos programas: *Blast* ([www.ncbi.nlm.nih.gov/blast](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast)), para a confirmação de homologia com o gene de interesse. A formação de estruturas como hairpins e *dimers* foi avaliada pelo programa *Gene Runner*. Os *primers* utilizados estão listados na Tabela 2.

### 3.16.3 Concentração dos *primers*

Em qPCR a concentração ideal de *primer* a ser utilizada, deve ser a mínima suficiente para permitir a duplicação de todas as cópias do material a cada ciclo de reação. Desta forma, utilizando a mesma quantidade de amostra, foram feitas reações contendo cada um dos *primers* (sense e anti-sense) nas concentrações finais de 70nM, 150 nM, 300 nM e 600 nM. A concentração ideal foi aquela em que o gene de interesse obteve o menor valor de Ct (ciclo *threshold*), ou seja, foi a concentração em que o gene foi amplificado mais precocemente. Na Tabela 2, estão listadas as concentrações dos *primers* utilizados na amplificação dos genes do estudo.

**Tabela 2.** Sequência dos *primers* utilizados, tamanho do fragmento amplificado e concentração ótima para amplificação dos genes a serem validados.

| <b>Genes</b> | <b>Primers</b>                                                          | <b>Tamanho fragmento amplificado</b> | <b>Concentração ótima</b> |
|--------------|-------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------|---------------------------|
| <i>BAC</i>   | S= 5'– AAAGAGATGGCCACGGCTGCT –3'<br>AS= 5'– TCGCTCCAACCGACTGCTGT –3'    | 79pb                                 | 150nM                     |
| <i>GAPDH</i> | S= 5'– GCACCGTCAAGGCTGAGAAC –3'<br>AS= 5'– CCACTTGATTTTGGAGGGATCT –3'   | 89pb                                 | 150nM                     |
| <i>IL6</i>   | S= 5'– CCAGGAGCCCAGCTATGAAC –3<br>AS= 5'– CCCAGGGAGAAGGCAACTG –3        | 64pb                                 | 70nM                      |
| <i>CCL5</i>  | S= 5'–TGCCTCCCCATATTCCTCG –3<br>AS= 5'–GTAGAAATACTCCTTGATGTGGGC–3       | 91pb                                 | 150nM                     |
| <i>ICAM1</i> | S= 5'– GGAAATACTGAACTTGCTGCCTA –3'<br>AS= 5'– ACACATGTCTATGGAGGGCCAC –3 | 81pb                                 | 150nM                     |
| <i>VWF</i>   | S= 5'– CAGGTCCAACAGAGTGACAGTGTT–3'<br>AS= 5'– CTTCGATTGCTGGAGCTTC –3    | 123pb                                | 300nM                     |
| <i>FAS</i>   | S= 5'–GTGAACACTGTGACCCTTGCA –3<br>AS= 5'–GCACACTCACCAGCAACACC –3        | 71pb                                 | 300nM                     |
| <i>TIMP1</i> | S= 5'– GGCTTCACCAAGACCTACA –3'<br>AS= 5'– TTGCAGGGGATGGATAAA –3         | 71pb                                 | 300nM                     |

S: sense; AS: anti-sense

### 3.16.4 Eficiência da reação

A reação de qPCR precisa ser confiável e reprodutiva. Para isso são necessárias condições ótimas de reação, em que as amplificações apresentem 100% de eficiência a cada ciclo da reação de PCR. A eficiência de amplificação é obtida pela fórmula  $10^{(-1/slope)}$ , na qual *slope* é derivado da inclinação da curva, e esse valor quando aplicado à fórmula de eficiência, tem que ser próximo de 2, que significa que a cada ciclo de amplificação o material genômico está sendo duplicado e isso equivale a 100% de eficiência (Meijerink *et al.*, 2001).

### 3.16.5 PCR quantitativa em tempo real (qPCR)

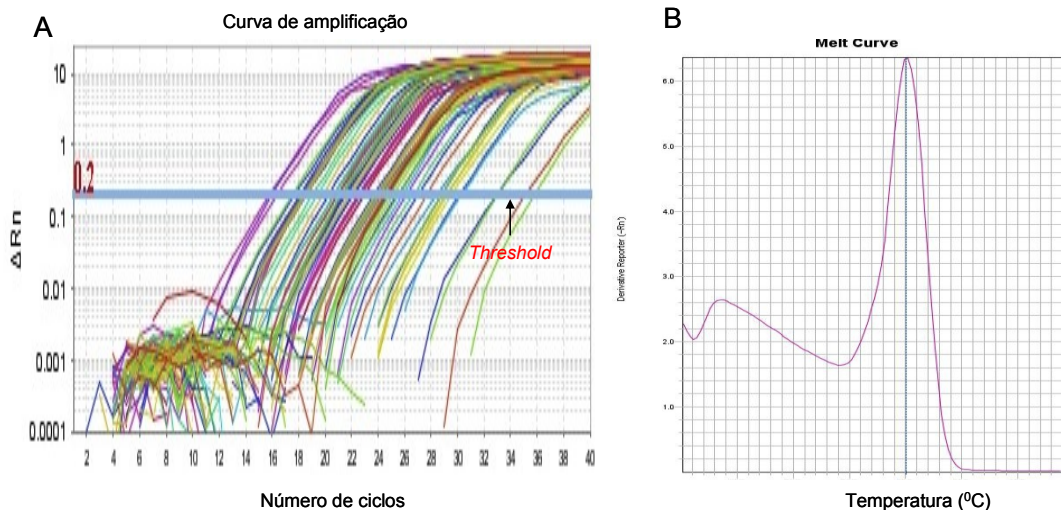
A PCR quantitativa em tempo real é uma técnica utilizada para a avaliação da expressão gênica. Consiste no monitoramento óptico da fluorescência emitida durante a reação de PCR (Higuchi *et al.*, 1993), por meio da ligação de uma sonda específica ou um corante na fita recém-sintetizada.

As reações de qPCR foram feitas em duplicatas e o sistema de detecção utilizado foi o reagente *SYBR<sup>TM</sup> Green PCR Master Mix®* (Invitrogen, Life Technologies) que contém todos os reagentes necessários para PCR (dNTP's, MgCl<sub>2</sub>, tampão, *Taq Ampli-Gold* e o corante *SYBR Green*). Para cada gene analisado, foram utilizados *primers* específicos.

A detecção da amplificação em tempo real foi realizada no equipamento *StepOne Plus* (Applied Biosystems, EUA), onde os resultados foram gerados na forma de gráficos de fluorescência versus número de ciclos.

Todas as amostras foram ensaiadas em 12µL de volume final, sendo 6,0µL do reagente *SYBR Green Master Mix 1x®*, 3,0µL de *mix* de amostra de cDNA (5ng/µL de concentração final) e 3,0µL *mix* do *primer*. Em todas as placas foram pipetados controles negativos, ou seja, para cada *primer* avaliado, foram feitos poços contendo água estéril em substituição à amostra. As reações foram realizadas em placas de 96 poços com tampas plásticas que permitiam a passagem da luz. O programa utilizado foi o mesmo da PCR *array*.

Na Figura 9, observam-se as representações gráficas dos resultados obtidos na qPCR. A curva de amplificação foi dada pela emissão do sinal fluorescente versus o número de ciclos na reação; quanto maior a fluorescência, maior o produto de PCR acumulado. Desta maneira, o valor utilizado para o cálculo da expressão (Ct) foi derivado da interseção do *threshold* (limiar de detecção estabelecido pelo usuário, na fase exponencial da reação) com a curva de amplificação. O gráfico resultante da curva de dissociação permitiu a verificação de produtos inespecíficos e formação de estruturas como *dimer*, de acordo com a temperatura de *melting* do produto gerado.



**Figura 9. Análise de expressão por qPCR. (A)** Expressão de genes de uma placa de PCR *array*, representados no gráfico de amplificação. **(B)** Gráfico de dissociação é referente ao controle endógeno *GAPDH*.

### 3.16.6 Análise dos dados de PCR em tempo real

A expressão dos genes de interesse foi determinada de forma relativa, ou seja, os valores de expressão foram normalizados em relação aos controles endógenos. Para esta análise foram utilizados os genes *BAC* (beta actina) e *GAPDH*.

Os valores de Ct de cada gene foram obtidos em duplicata; desta forma, foi calculada a média aritmética dos genes para cada amostra que teve um determinado gene estudado. Em seguida, foi obtido o valor de delta Ct ( $\Delta Ct$ ), que consistiu na subtração do menor Ct de um gene de determinada amostra com os demais Cts deste mesmo gene de outras amostras estudadas. O próximo cálculo foi o valor de “Q”, que corresponde a  $2^{\Delta Ct}$ . Os valores de Q dos genes *BAC* e *GAPDH*, de cada amostra analisada, foram submetidos ao programa *geNorm* (Vandesompele et al., 2002), que calculou a média geométrica entre eles, valor este denominado de Fator de Normalização da amostra. A expressão normalizada de um dado gene, em uma determinada amostra, foi dada pela razão entre o valor Q do gene pelo fator de normalização desta mesma amostra. O valor obtido foi expresso em unidades arbitrárias (U.A.).

### 3.17 Análise Estatística

Os resultados foram apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média. Para comparar três ou mais grupos, foi utilizado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de Dunn ou teste de Mann-Whitney para a comparação entre dois grupos. Para a análise de diferentes tratamentos, no mesmo grupo de BOEC, foi aplicado o teste de Wilcoxon para comparar dois grupos e Friedman, seguido pelo teste de Dunn, para três ou mais grupos. O teste t-Student foi empregado pelo *software: RT<sup>2</sup> profiler PCR array data analysis version 3.5* (<http://pcrdataanalysis.sabiosciences.com/pcr/arrayanalysis.php>), que analisou os resultados de expressão gênica da PCR array. Os gráficos foram obtidos, utilizando-se o programa GraphPad Prism 4 (*GraphPad Software, Inc.*); os cálculos foram efetuados no programa Graphpad INSTAT (*GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA*). Os valores de P, menor ou igual a 0,05, foram considerados como estatisticamente significativos.



# ***RESULTADOS***



## 4 RESULTADOS

### 4.1 Estabelecimento da cultura de BOEC

A cultura de células BOEC foi estabelecida para indivíduos-controle (Con; N=6), pacientes com anemia falciforme sem uso de hidroxiureia (SS; N=5), em uso de hidroxiureia (SSHU; N=3) ou em transfusão sanguínea regular (SSTrf; N=3). Assim, como relatado em outros estudos (Stronceck *et al.*, 2009; Rignault-Clerc *et al.*, 2012 ), foi possível obter aproximadamente 50% de sucesso de estabelecimento das culturas. Não houve interferência de sexo ou idade no sucesso do isolamento de BOECs, porém, o estabelecimento dessa cultura foi mais difícil para os indivíduos-controle (43%) quando comparado com pacientes AF. A Tabela 3 mostra as características, dados hematológicos e sucesso das culturas dos indivíduos que doaram o sangue para a realização desse método.

Durante a cultura, foi observado o aparecimento das células progenitoras endoteliais precoces nos primeiros sete dias, as quais morreram no decorrer do cultivo (Figura 10 A). Em torno de 14 dias (média de 10 a 23 dias) de cultura, surgiram as primeiras colônias de BOECs (Figuras 10 B). Em quatro culturas foram observadas BOECs com proliferação lenta e aspecto morfológico de células envelhecidas (Figura 10 C). Em outras três culturas, cresceram células que não apresentaram morfologia característica de BOEC, as quais foram caracterizadas por citometria de fluxo como células mesenquimais, pois apresentaram positividade para marcadores CD90, CD73, CD105 e CD29 e foram negativas para CD34, CD45, CD31 e HLA DR. Além disso, as células mesenquimais proliferaram muito mais rapidamente que as BOECs (Figuras 10 D).

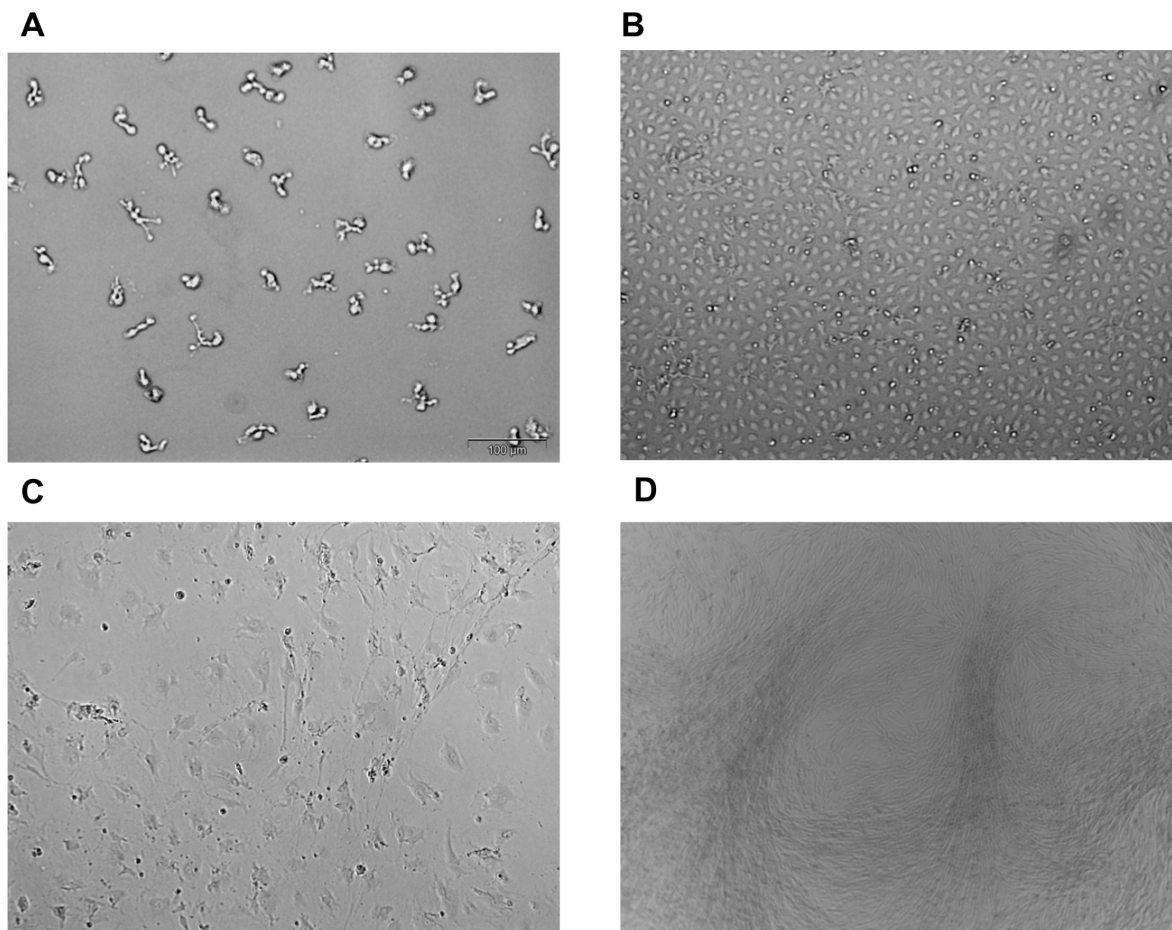
Em torno de 42 dias (média de 31 a 58 dias) de cultura, foi possível obter número de células suficiente para a realização da caracterização das BOECs por citometria de fluxo. As células foram consideradas BOECs quando positivas para marcadores endoteliais CD31, CD105, CD146, CD144, VEGFR-2/KDR e podendo ou não ser positivas para CD34; negativas para marcadores de leucócitos (CD45 e CD14) e também para o marcador de célula progenitora endotelial (CD133) (Van Beem *et al.*, 2008) (Figura 11). Uma vez caracterizadas as BOECs, parte destas foram congeladas em nitrogênio líquido e outra parte das células foram proliferadas para se obter quantidade suficiente de células para a realização dos experimentos.

Após sua caracterização por citometria de fluxo, as BOECs SStrf foram submetidas ao sequenciamento gênico com o intuito de detectar a mutação do gene da HbS, descartando assim, a eventual possibilidade das células endoteliais serem dos doadores de sangue. Todos os sequenciamentos foram positivos para essa mutação (Figura 12).

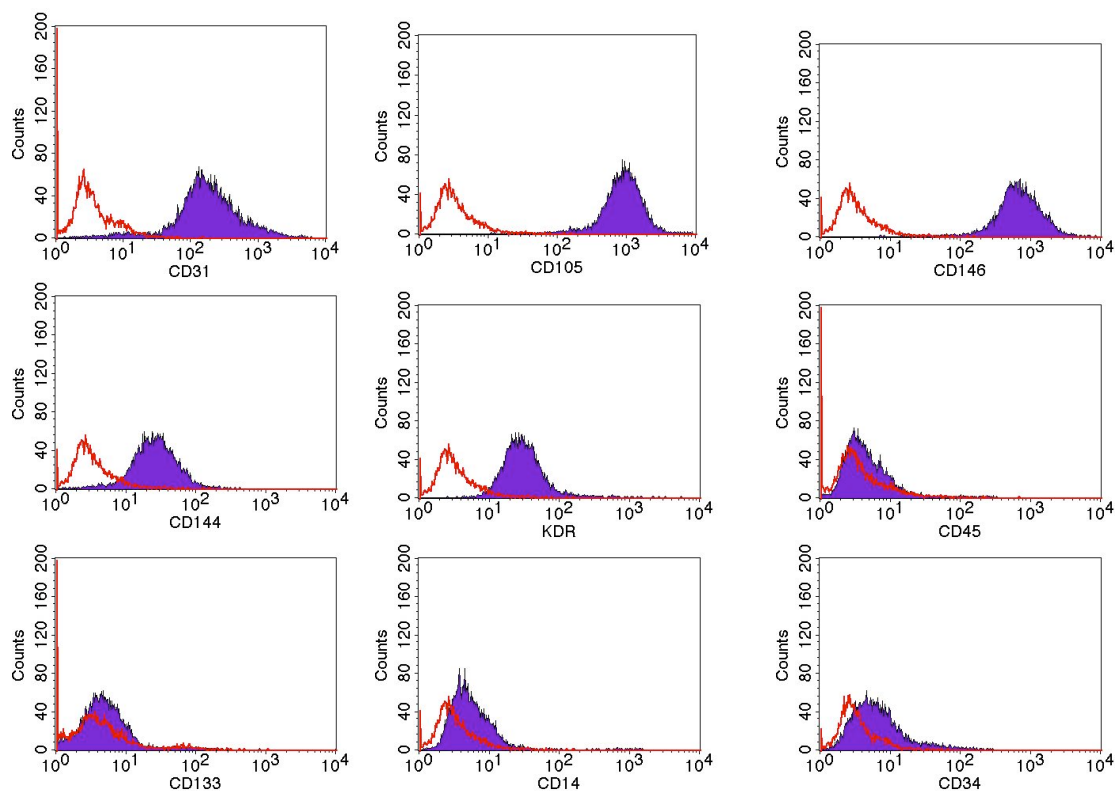
**Tabela 3.** Características e dados hematológicos e sucesso das culturas de BOEC de indivíduos-controle e de pacientes com anemia falciforme.

|                                                  | <b>Con<br/>N=14</b>  | <b>Pacientes SS<br/>N=7</b> | <b>Pacientes<br/>SSHU<br/>N=5s</b> | <b>Pacientes<br/>SSTrf<br/>N=3</b> |
|--------------------------------------------------|----------------------|-----------------------------|------------------------------------|------------------------------------|
| <b>Idade (anos)</b>                              | 32,5 (22-57)         | 31,8 (21-48)                | 36 (20-53)                         | 36,7 (27-46)                       |
| <b>Feminino / Masculino</b>                      | 8 / 6                | 4 / 3                       | 2 / 3                              | 2 / 1                              |
| <b>Hb (g/dL)</b>                                 | 14,2<br>(11,5-16,0)  | 8,7<br>(7,7-10,1) **        | 9,5<br>(8,6-12,1)*                 | 10,5<br>(10,0-10,8)                |
| <b>Leucócitos (x10<sup>9</sup> /L)</b>           | 5,5<br>(4,4-6,1)     | 11,9<br>(8,0-15,6)*         | 7,7<br>(5,7-10,4)                  | 13,3<br>(11,0-17,7)*               |
| <b>Plaquetas (x10<sup>9</sup> /L)</b>            | 256<br>(226-343)     | 531<br>(447-604)*           | 413<br>(292-540)                   | 612<br>(323-967)                   |
| <b>Reticulócitos (x10<sup>9</sup> /L)</b>        | 77,7<br>(44,8-166,0) | 311,9<br>(234,9-343)**      | 259,2<br>(167-505)                 | 93,4                               |
| <b>Sucesso na cultura:</b>                       |                      |                             |                                    |                                    |
| <b>Sim (fem/masc)</b>                            | 5 (2 / 3)            | 2 (0 / 2)                   | 3 (1 / 2)                          | 3 (2 / 1)                          |
| <b>Não (fem/masc)</b>                            | 6 (5 / 1)            | 1 (1 / 0)                   | 2 (1 / 1)                          | -                                  |
| <b>Baixa proliferação<br/>    (fem/masc)</b>     | 1 (0 / 1)            | 3 (2 / 1)                   | -                                  | -                                  |
| <b>Outros tipos celulares<br/>    (fem/masc)</b> | 2 (1 / 1)            | 1 (1 / 0)                   | -                                  | -                                  |

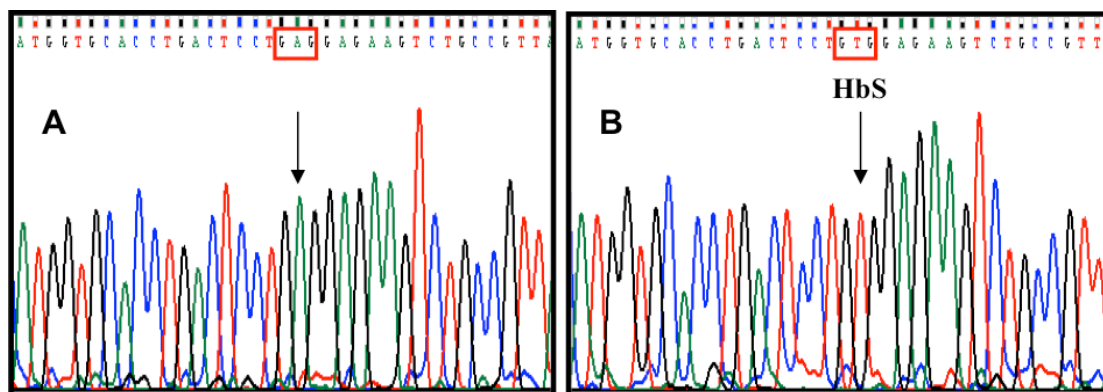
Con: indivíduos-controle; SS: pacientes AF sem uso de HU; SSHU: pacientes AF em tratamento com HU; SStrf: pacientes AF em transfusão regular; fem: sexo feminino; masc: sexo masculino. Resultados expressos em média (mínima, máxima). \*P<0,05; \*\*P<0,01, quando comparado aos indivíduos-controle. Teste de Kruskal Wallis seguido do Teste de Dunn.



**Figura 10. Morfologia das células obtidas na cultura de BOECs. (A)** Células endoteliais progenitoras precoces, na forma de *spindle-shaped*, cultura de paciente com AF, 7 dias; **(B)** BOECs com a morfologia característica de *cobblestone*, cultura de paciente com AF, 21 dias; **(C)** BOEC de baixa proliferação, cultura de paciente com AF, 40 dias; **(D)** células mesenquimais, cultura de indivíduo-controle, 12 dias. Microscópio invertido, aumento de 10x.



**Figura 11. Caracterização das BOECs por citometria de fluxo.** As BOECs apresentaram positividade para múltiplos marcadores de células endoteliais (CD31, CD105, CD146, CD144, KDR). Os Dados apresentados são derivados da cultura de BOECs de um indivíduo-controle, em 45 dias de cultura, sendo representativo de onze pacientes AF e seis indivíduos-controle.



**Figura 12. Sequenciamento parcial do gene da globina  $\beta$  humana de amostra de DNA extraído de BOECs de controle e paciente com anemia falciforme em transfusão regular (SSTrf). (A) Cromatograma para o alelo normal, em destaque, códon 6 (GAG). (B) Cromatograma para o alelo mutado (HbS), identificando a substituição do ácido glutâmico pela valina no códon 6 (GTG), resultado representativo de três BOECs SSTrf.**

#### 4.2 Quantificação das células endoteliais circulantes

As amostras de sangue periférico de indivíduos-controle (Con) e de pacientes AF, com ou sem uso de HU (SSHU e SS respectivamente), foram utilizadas para a quantificação das células endoteliais circulantes maduras (CECs) e das células endoteliais progenitoras (CEPs) por citometria de fluxo.

Os pacientes SSHU (N=19) apresentaram aumento significativo no número de CECs, quando comparado com Con (N=10), no entanto com grande variação de intervalo entre os valores. (Tabela 4).

**Tabela 4.** Número de CECs/ $\mu$ L e CEPs/ $\mu$ L nos controles e pacientes com anemia falciforme.

| Parâmetros      | Con<br>N=10      | Pacientes SS<br>N=5 | Pacientes SSHU<br>N=19 |
|-----------------|------------------|---------------------|------------------------|
| CECs ( $\mu$ L) | 0,75 (0,09-1,34) | 1,01 (0,54-1,71)    | 3,42 (0,08-20,45)*     |
| CEPs ( $\mu$ L) | 0,25 (0,0-0,90)  | 0,33 (0,0-0,90)     | 0,26 (0,0-1,14)        |

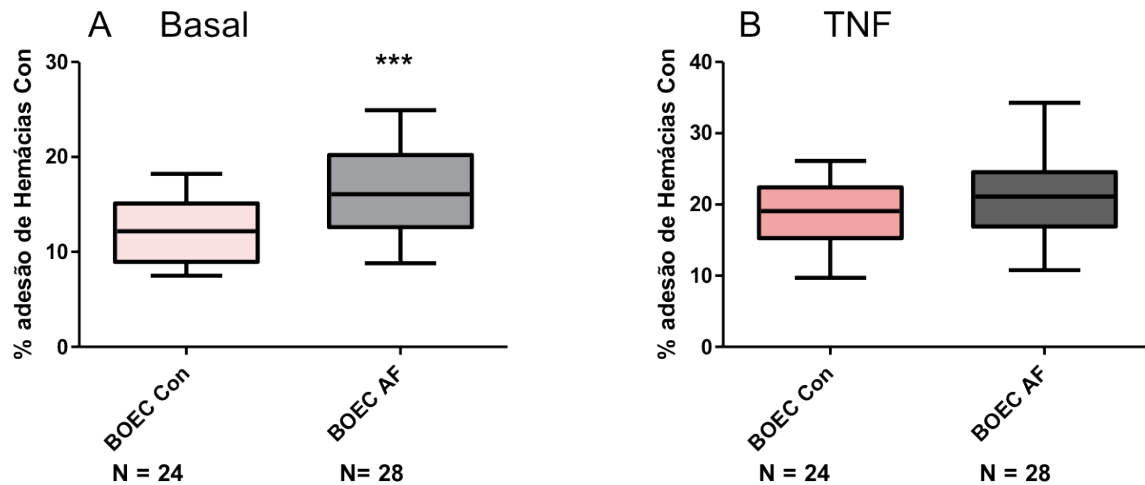
CECs: células endoteliais circulantes maduras, CEPs: células endoteliais progenitoras, Con: indivíduos-controle; SS: pacientes AF sem uso de HU; SSHU: pacientes AF em tratamento com HU. Resultados expressos em média (mínima, máxima). \*P<0,05, quando comparado à indivíduos-controle. Teste de Kruskal Wallis seguido do Teste de Dunn.

#### 4.3 Ensaio *in vitro* de adesão celular estática

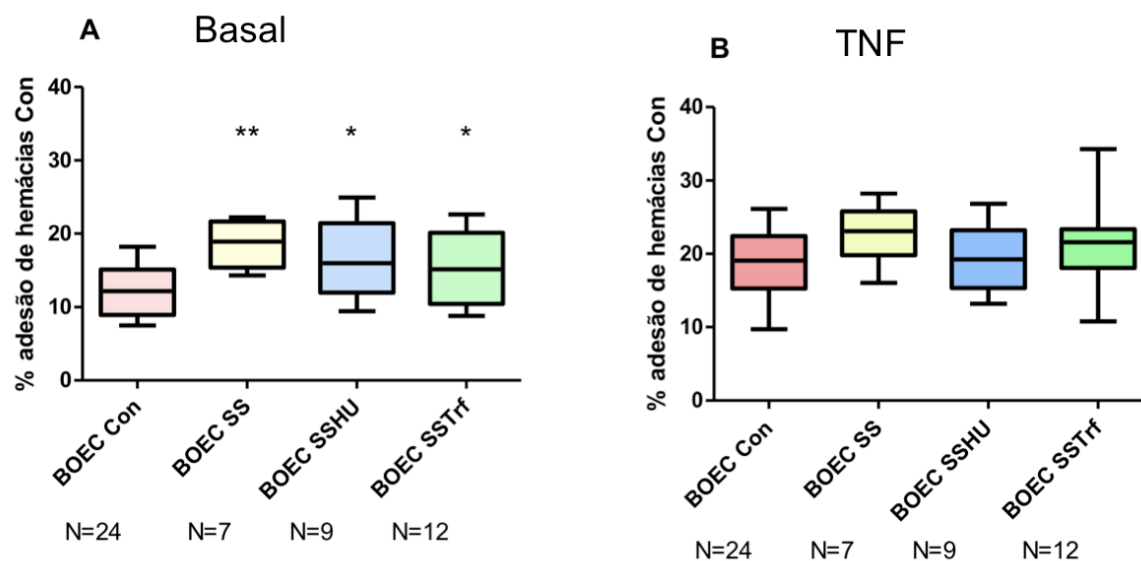
As hemácias de indivíduos-controle e de pacientes com AF foram utilizadas para a realização de ensaio de adesão às BOECs de controle (BOEC Con; N=5), de pacientes com anemia falciforme (BOEC AF; N=9). O ensaio de adesão foi realizado em triplicata para cada indivíduo, em condição basal e com as BOECs estimuladas com TNF- $\alpha$  (10ng/mL, 3h, 37°C, 5%CO<sub>2</sub>).

#### 4.4.1 Adesão de hemácias de indivíduos-controle às BOECs

As hemácias de indivíduos-controle (Con) aderiram mais significativamente às BOECs derivadas de pacientes com AF ( $P<0,001$ ), quando comparado à adesão em BOECs Con. (Figura 13 A). Os resultados obtidos de adesão das hemácias de controle de acordo com os tipos de BOECs AF (SS, SSHU e SStrf) mostram um aumento significativo de adesão em relação às BOECs Con (Figura 14 A). No entanto, na presença de  $\text{TNF-}\alpha$ , não houve diferença significativa na adesão entre os tipos de BOECs (Figuras 13 B e 14 B).



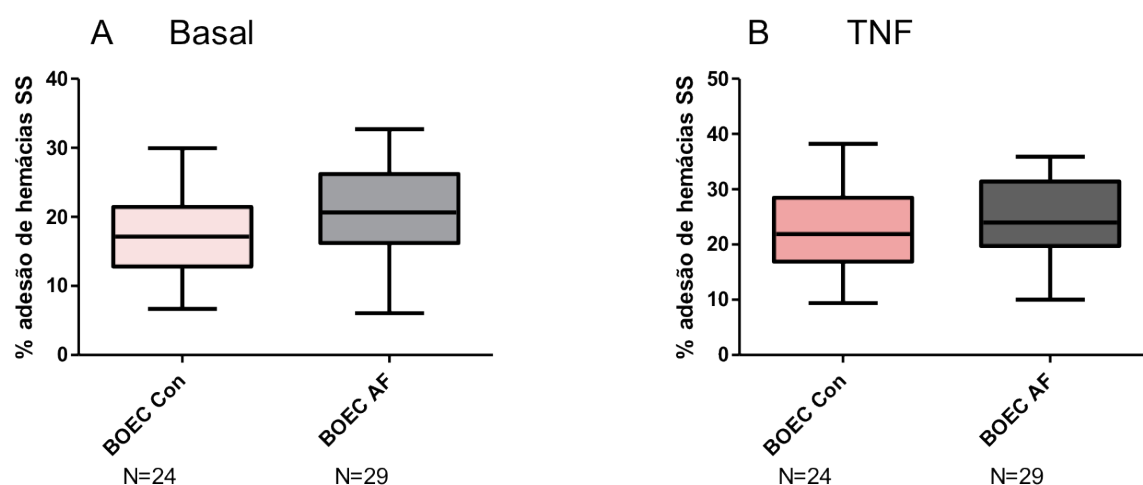
**Figura 13.** Adesão de hemácias de indivíduos-controle (Con) à BOEC Con (indivíduos-controle) e BOEC AF (pacientes com anemia falciforme). BOECs sob (A) condição basal e (B) após estímulo de  $\text{TNF-}\alpha$  (10ng/mL, 3h, 37°C, 5%  $\text{CO}_2$ ). As hemácias foram incubadas por 30min à 37°C, em estufa a 5%  $\text{CO}_2$ , em placas previamente cobertas com BOECs. Resultados expressos em média de % de células aderidas  $\pm$  erro padrão da média. \*\*\* $P<0.01$ , comparado à adesão em BOEC Con. Teste de Mann-Whitney.



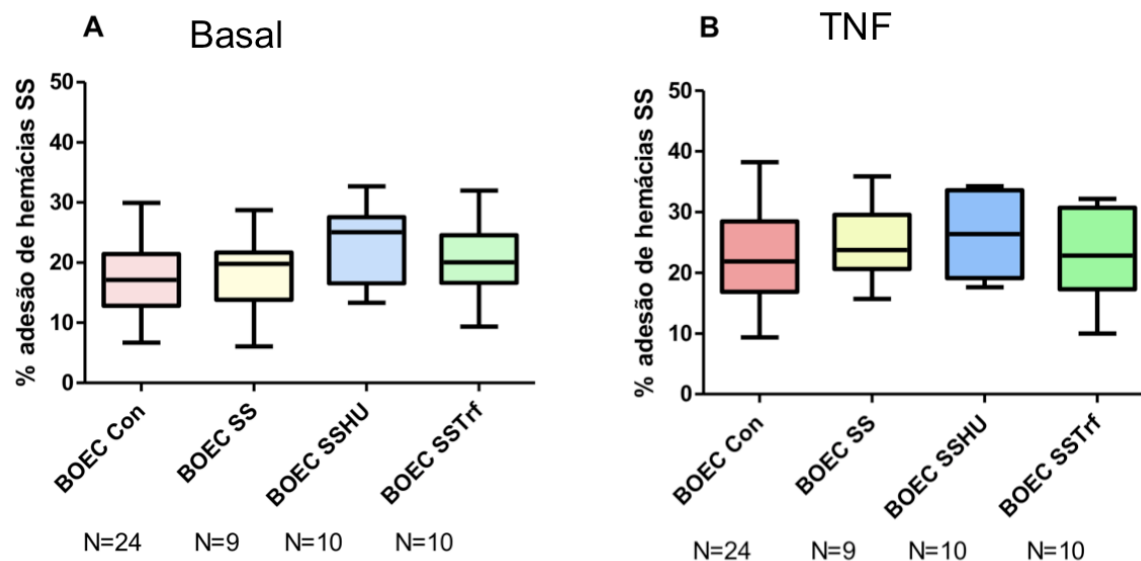
**Figura 14.** Adesão de hemácias de indivíduos-controle (Con) à BOEC Con (indivíduos-controle); BOEC SS (pacientes AF sem uso de HU); BOEC SSHU (pacientes AF em tratamento com HU); BOEC SSTrf (pacientes AF em transfusão). BOECs sob (A) condição basal e (B) após estímulo de TNF- $\alpha$  (10ng/mL, 3h, 37°C, 5% CO<sub>2</sub>). As hemácias foram incubadas por 30min à 37°C, em estufa a 5% CO<sub>2</sub>, em placas previamente cobertas com BOECs. Resultados expressos em média de % de células aderidas  $\pm$  erro padrão da média. \*\*P<0.01, \*P<0,05, comparado à adesão em BOEC Con. Teste de Kruskal Wallis seguido do Teste de Dunn.

#### 4.4.2 Adesão de hemácias de pacientes SS

Em condição basal, não houve diferença significativa da adesão das hemácias de pacientes com anemia falciforme, sem uso de HU (SS), entre as BOECs Con e BOECs AF ( Figura 15 A), resultado também observado quando a adesão foi comparada entre os tipos de BOECs AF (SS, SSHU e SStrf) e BOEC Con (Figura 16 A). Sob estímulo de TNF- $\alpha$  não houve diferença significativa de adesão entre os tipos de BOECs (Figuras 15 B e 16 B).



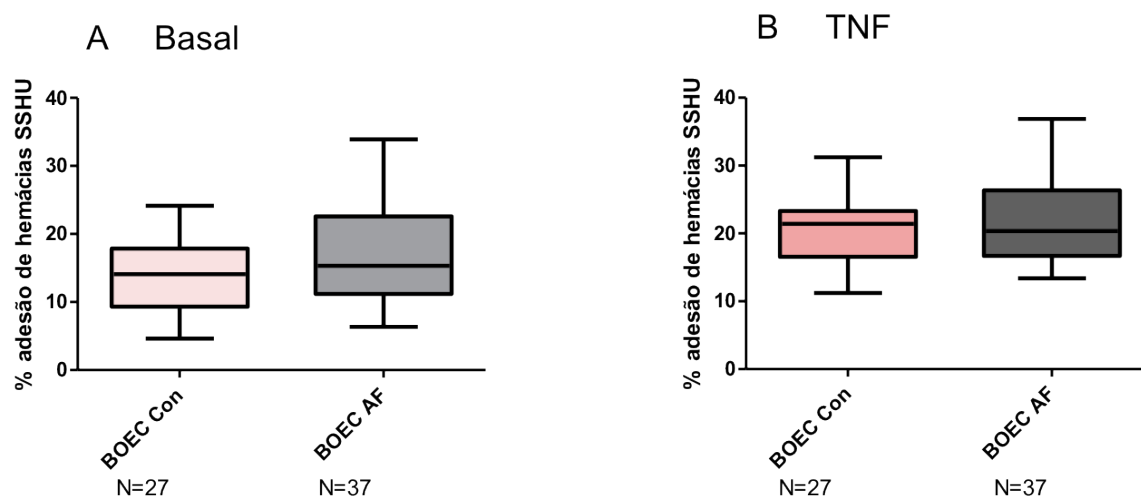
**Figura 15.** Adesão de hemácias de pacientes AF sem uso de hidroxiureia (SS) à BOEC Con (indivíduos-controle) e BOEC AF (pacientes com anemia falciforme). BOECs sob (A) condição basal e (B) após estímulo de TNF- $\alpha$  (10ng/mL, 3h, 37°C, 5% CO<sub>2</sub>). As hemácias foram incubadas por 30min à 37°C, em estufa a 5% CO<sub>2</sub>, em placas previamente cobertas com BOECs. Resultados expressos em média de % de células aderidas  $\pm$  erro padrão da média. P>0,05. Teste de Mann-Whitney.



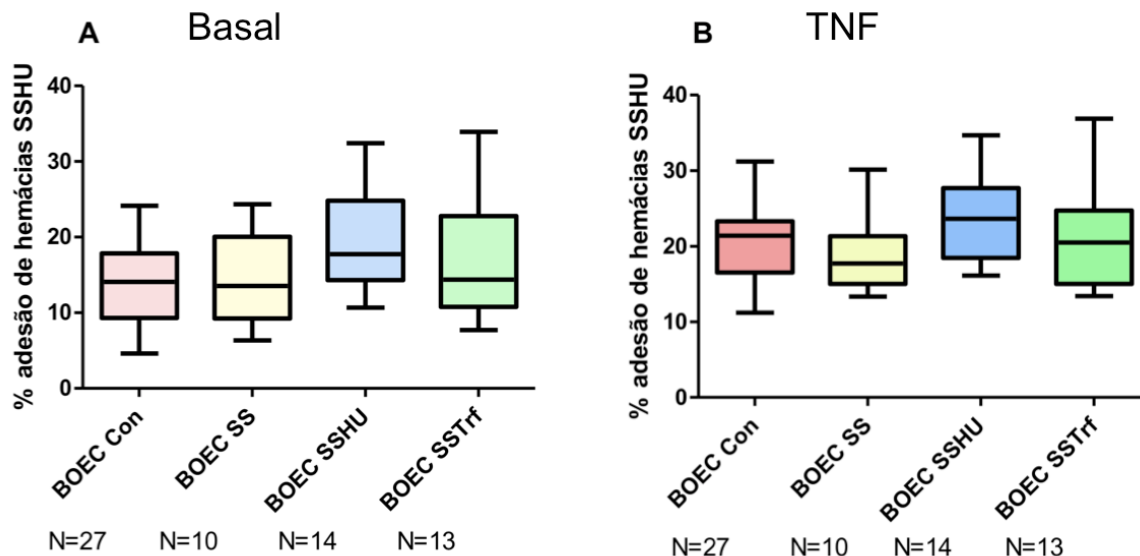
**Figura 16.** Adesão de hemácias de pacientes AF sem uso de hidroxiureia (SS) à BOEC Con (indivíduos-controle); BOEC SS (pacientes AF sem uso de HU); BOEC SSHU (pacientes AF em tratamento com HU); BOEC SStrf (pacientes AF em transfusão). BOECs sob (A) condição basal e (B) após estímulo de TNF- $\alpha$  (10ng/mL, 3h, 37<sup>0</sup>C, CO<sub>2</sub>). Hemácias foram incubadas por 30min à 37°C, em estufa a 5% CO<sub>2</sub>, em placas previamente cobertas com BOECs. Resultados expressos em média de % de células aderidas  $\pm$  erro padrão da média. P>0,05. Teste de Kruskal Wallis seguido do Teste de Dunn.

### 4.3.3 Adesão de hemácias de pacientes SSHU

Em condição basal ou após estímulo de TNF- $\alpha$ , as hemácias SSHU não apresentaram diferença significativa de adesão entre as BOECs Con e BOECs AF ( Figuras 17 A e B), e quando comparada a adesão entre as BOECs Con e BOECs SS, SSHU e SSTrf (Figuras 18 A e B).



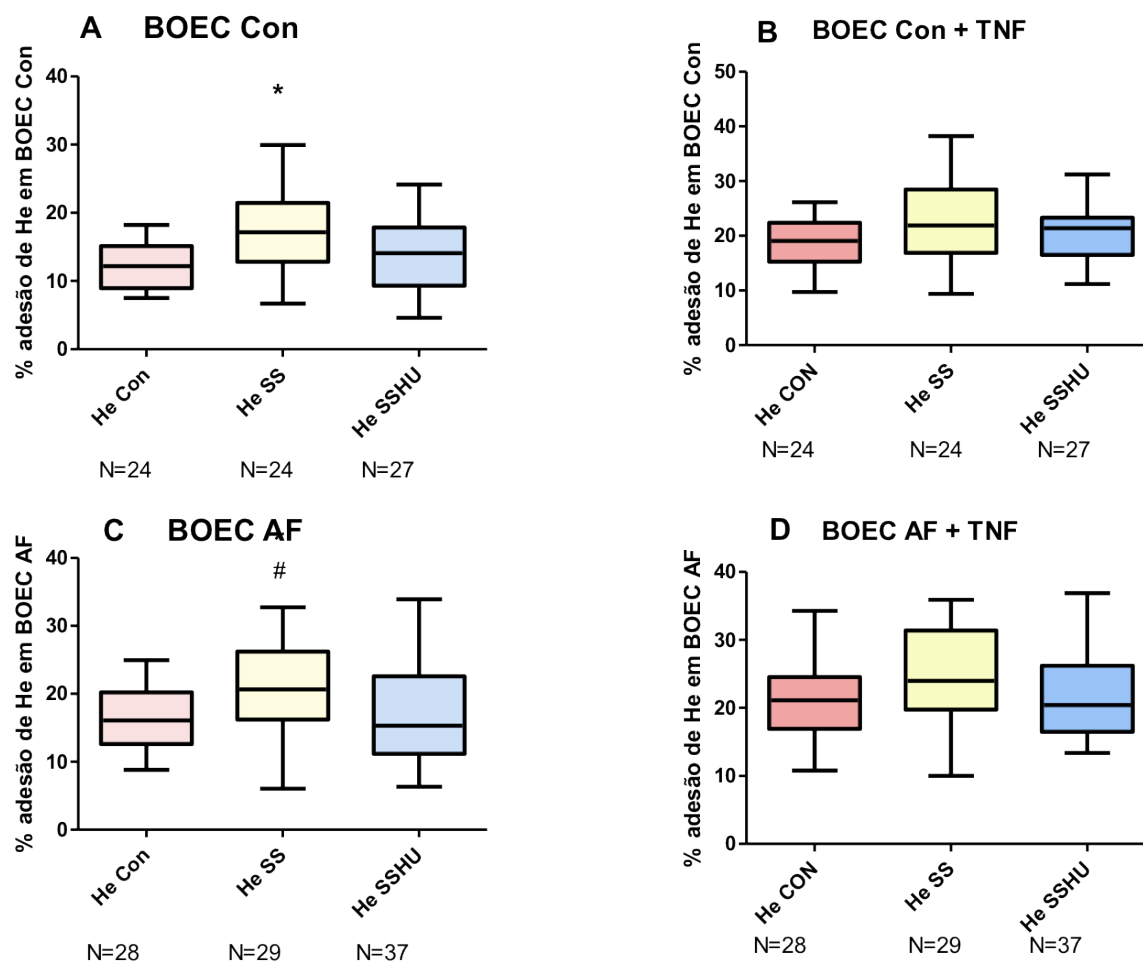
**Figura 17.** Adesão de hemácias de pacientes AF em uso de HU (SSHU) à BOEC Con (indivíduos-controle) e BOEC AF (pacientes com anemia falciforme). BOECs sob **(A)** condição basal e **(B)** após estímulo de TNF- $\alpha$  (10ng/mL, 3h, 37°C, 5% CO<sub>2</sub>). As hemácias foram incubadas por 30min à 37°C, em estufa a 5% CO<sub>2</sub>, em placas previamente cobertas com BOECs. Resultados expressos em média de % de células aderidas  $\pm$  erro padrão da média.  $P > 0,05$ . Teste de Mann-Whitney.



**Figura 18.** Adesão de hemácias de pacientes AF em uso de HU (SSHU) em BOEC Con (indivíduos-controle); BOEC SS (pacientes AF sem uso de HU); BOEC SSHU (pacientes AF em tratamento com HU); BOEC SStrf (pacientes AF em transfusão). BOECs sob (A) condição basal e (B) após estímulo de TNF- $\alpha$  (10ng/mL, 3h, 37°C, CO<sub>2</sub>). Hemácias foram incubadas por 30min à 37°C, em estufa a 5% CO<sub>2</sub>, em placas previamente cobertas com BOECs. Resultados expressos em média de % de células aderidas  $\pm$  erro padrão da média. P>0,05. Teste de Kruskal Wallis seguido do Teste de Dunn.

#### 4.4.4 Adesão de hemácias de controles e pacientes AF

Analizando a adesão entre os grupos de hemácias Con, SS e SSHU, as hemácias de pacientes SS aderiram significativamente mais nas BOECs de Con e nas BOECs de pacientes AF, no estado basal, quando comparada à adesão de hemácias de indivíduos-controle (Figuras 19 A e C) e de hemácias SSHU (Figura 19 C). Sob estímulo de TNF- $\alpha$  não houve diferença significativa de adesão entre os grupos de hemácias (Figuras 19B B e 19 D).



**Figura 19.** Adesão de hemácias de indivíduos-controle (Con), de pacientes AF sem HU (SS) e de pacientes AF em uso de HU (SSHU) em BOECs. **(A)** BOECs de indivíduos-controle, condição basal; **(B)** BOECs de indivíduos-controle, após estímulo de TNF- $\alpha$ ; **(C)** BOECs de pacientes AF, condição basal; **(D)** BOECs de pacientes AF, após estímulo de TNF- $\alpha$ . As hemácias foram incubadas por 30min à 37°C, em estufa a 5% CO<sub>2</sub>, em placas previamente cobertas com BOECs. Resultados expressos em média de % de células aderidas  $\pm$  erro padrão da média. \*P<0,05, comparado à adesão de hemácias-controle. #P<0,05, comparado à adesão de hemácias SSHU. Teste de Kruskal Wallis seguido do Teste de Dunn.

#### **4.5 Avaliação da expressão das moléculas de adesão na superfície das BOECs**

Pelo método de citometria de fluxo, as expressões das moléculas de adesão: VCAM-1 (CD106), selectina-P (CD62P), selectina-E (CD62E), CD36, integrina  $\alpha_v\beta_3$  (CD51/CD61), ICAM-1 (CD54), Lu/BCAM (CD239) foram determinadas na superfície de BOECs de indivíduos-controle (N=5) e BOECs de pacientes com anemia falciforme (N $\geq$ 7), em triplicatas para cada BOEC de indivíduo analisada e na presença ou ausência de TNF- $\alpha$  (10ng/mL, 3h, 37<sup>0</sup>C, CO<sub>2</sub>). A expressão foi avaliada por dois parâmetros: a) porcentagem de células positivas para os receptores, medida que é expressa em porcentagem (%) e b) por média de intensidade de fluorescência por célula (MIF), que corresponde a quantidade de expressão da molécula por célula.

As Tabelas 5 e 6 mostram os resultados em % de células e em MIF respectivamente e não foram encontradas diferenças significativas de expressão das moléculas de adesão avaliadas nas BOECs Con e BOECs AF, em ambas condições basal e após estímulo de TNF- $\alpha$ .

**Tabela 5.** Expressão de moléculas de adesão na superfície das BOECs (% de células expressando).

| <b>% de células <math>\pm</math> SEM</b>        |                       |                  |                                      |                 |
|-------------------------------------------------|-----------------------|------------------|--------------------------------------|-----------------|
| <b>Moléculas de adesão</b>                      | <b>BOEC Con (N=5)</b> |                  | <b>BOEC AF (N<math>\geq</math>7)</b> |                 |
|                                                 | <b>Basal</b>          | <b>TNF</b>       | <b>Basal</b>                         | <b>TNF</b>      |
| <b>VCAM-1 (CD106)</b>                           | 4,3 $\pm$ 1,1         | 57,4 $\pm$ 17,6  | 8,9 $\pm$ 2,2                        | 73,1 $\pm$ 8,1  |
| <b>Selectina-P (CD 62P)</b>                     | 1,6 $\pm$ 0,3         | 1,5 $\pm$ 0,4    | 2,9 $\pm$ 0,9                        | 3,0 $\pm$ 1,0   |
| <b>Selectina-E (CD 62E)</b>                     | 9,9 $\pm$ 3,0         | 84,3 $\pm$ 8,3   | 13,4 $\pm$ 3,0                       | 86,1 $\pm$ 2,8  |
| <b>CD 36</b>                                    | 5,4 $\pm$ 1,9         | 12,4 $\pm$ 7,1   | 12,2 $\pm$ 6,3                       | 0,8 $\pm$ 0,5   |
| <b><math>\alpha_v\beta_3</math> (CD51/CD61)</b> | 97,6 $\pm$ 1,3        | 97,2 $\pm$ 1,1   | 95,0 $\pm$ 2,6                       | 96,8 $\pm$ 1,4  |
| <b>ICAM-1 (CD54)</b>                            | 93,9 $\pm$ 2,3        | 99,7 $\pm$ 0,2   | 87,6 $\pm$ 4,4                       | 98,8 $\pm$ 0,6  |
| <b>Lu/BCAM (CD239)</b>                          | 44,6 $\pm$ 10,6       | 50,76 $\pm$ 12,6 | 54,0 $\pm$ 10,2                      | 57,2 $\pm$ 10,6 |

BOEC Con: indivíduos-controle, BOEC AF: pacientes com anemia falciforme. Os resultados da expressão das moléculas de adesão estão representados como porcentagem de BOECs positivas marcadas  $\pm$  erro médio padrão.  $P>0,05$ . Teste de Mann-Whitney.

**Tabela 6.** Expressão de moléculas de adesão de superfície das BOECs (média de intensidade de fluorescência).

| <b>MIF de células ± SEM</b>                     |                       |                 |                      |                |
|-------------------------------------------------|-----------------------|-----------------|----------------------|----------------|
| <b>Moléculas de adesão</b>                      | <b>BOEC Con (N=5)</b> |                 | <b>BOEC AF (N≥7)</b> |                |
|                                                 | <b>Basal</b>          | <b>TNF</b>      | <b>Basal</b>         | <b>TNF</b>     |
| <b>VCAM-1 (CD106)</b>                           | 629 ± 55              | 1.302 ± 214     | 787 ± 91             | 1.254 ± 214    |
| <b>Selectina-P (CD 62P)</b>                     | 701 ± 82              | 617 ± 62        | 756 ± 97             | 768 ± 87       |
| <b>Selectina-E (CD 62E)</b>                     | 1.609 ± 332           | 4.867 ± 680     | 2.155 ± 252          | 6.318 ± 881    |
| <b>CD 36</b>                                    | 715 ± 155             | 816 ± 145       | 1046 ± 170           | 1.158 ± 199    |
| <b><math>\alpha_v\beta_3</math> (CD51/CD61)</b> | 5.049 ± 374           | 5.236 ± 469     | 6.141 ± 324          | 6.557 ± 456    |
| <b>ICAM-1 (CD54)</b>                            | 10.830 ± 2.214        | 60.205 ± 10.658 | 14.230 ± 4.162       | 74.674 ± 6.889 |
| <b>Lu/BCAM (CD239)</b>                          | 1.480 ± 336           | 1.571 ± 294     | 2.075 ± 491          | 1.842 ± 436    |

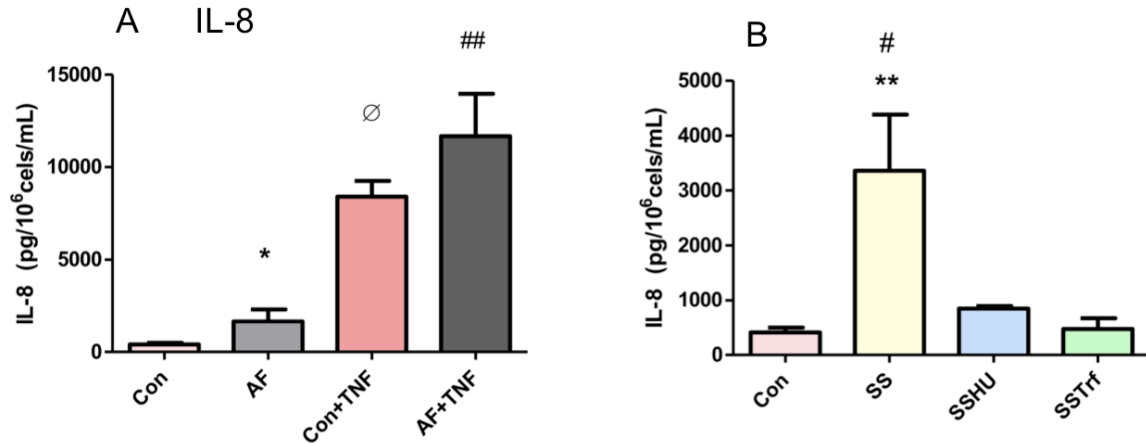
BOEC Con: indivíduos-controle, BOEC AF: pacientes com anemia falciforme. Os resultados da expressão das moléculas de adesão estão representados como média de intensidade de fluorescência por BOEC marcada. ± erro médio padrão. P>0,05. Teste de Mann-Whitney.

#### **4.6 Dosagem de mediadores inflamatórios**

Como a anemia falciforme cursa com inflamação e disfunção endotelial, foi feita a dosagem por ELISA de algumas citocinas e quimiocinas inflamatórias como GM-CSF, IL-8, IL-6, MCP-1, CCL-5 e ET-1, que são produzidos por células endoteliais.

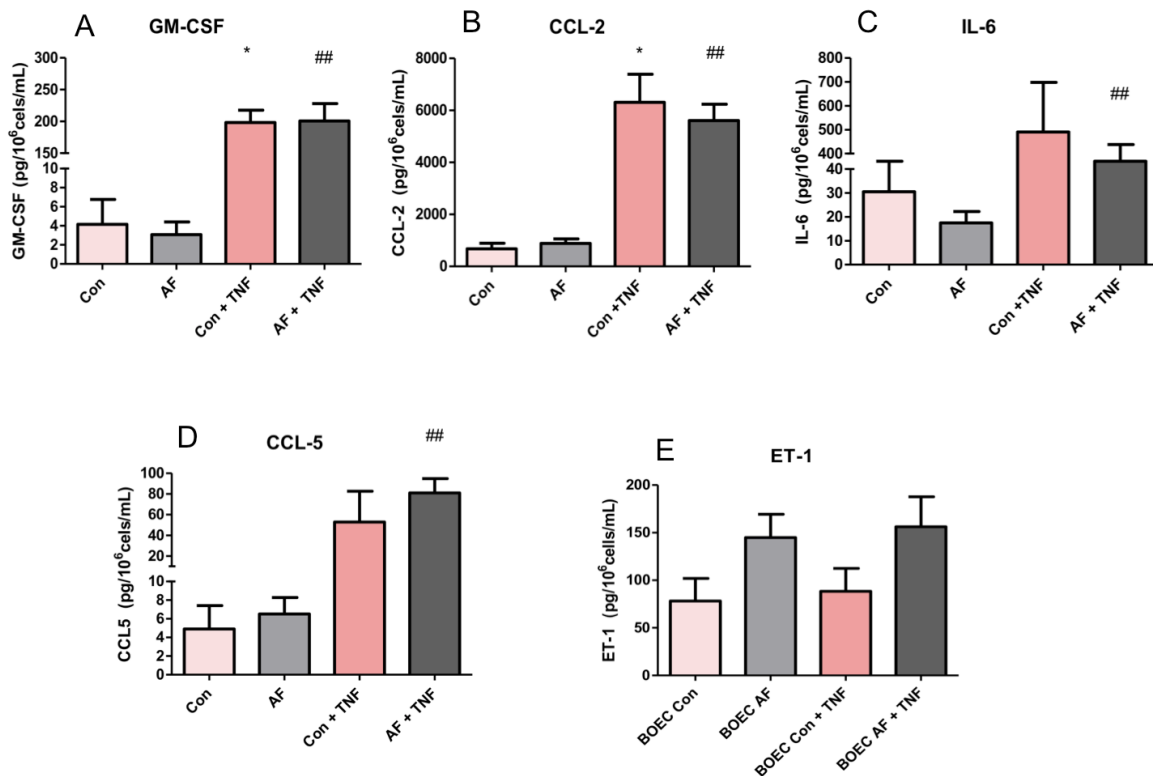
A dosagem foi realizada nos sobrenadantes coletados das culturas de BOECs de indivíduos-controle (N=5) e de pacientes com AF (N=9), em condição basal e após tratamento com sinvastatina e/ou TNF- $\alpha$ . Os mediadores inflamatórios foram dosados em duplicatas nos sobrenadantes de BOEC de cada indivíduo.

Os sobrenadantes de culturas de BOEC AF apresentaram níveis significativamente elevados de IL-8, quando comparados aos sobrenadantes de BOEC Con em condição basal (Figura 20 A). Os resultados foram estratificados de acordo com o tipo de BOEC AF e as BOECs SS tiveram a maior dosagem significativa de IL-8, comparada à BOEC Con e BOEC SStrf (Figura 20 B). Após estímulo de TNF- $\alpha$  houve diferença nos níveis de IL-8 comparando as BOECs Con e BOECs AF tratadas (Figura 20 A).



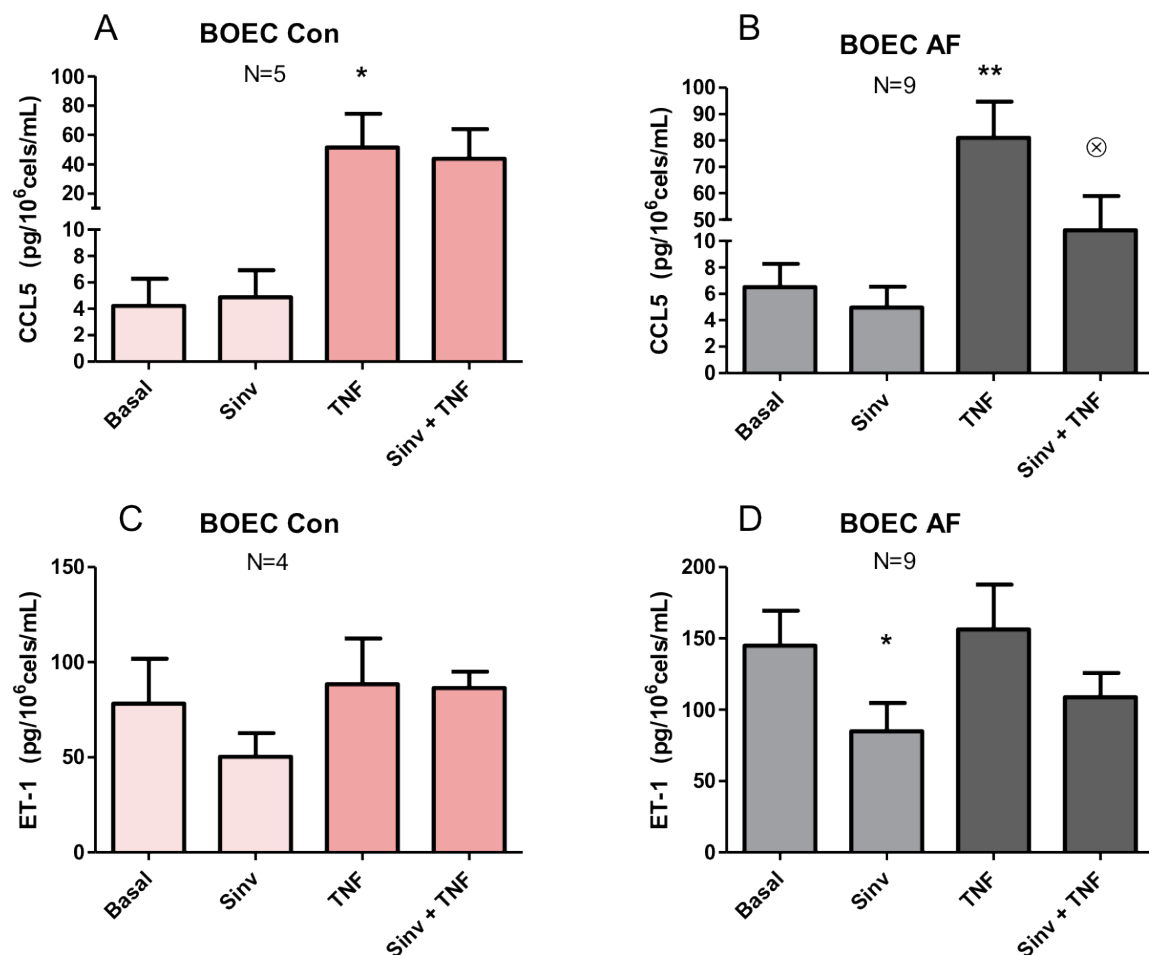
**Figura 20. (A)** Níveis de IL-8 dos sobrenadantes de cultura de BOECs Con (indivíduos-controle, N=5) e AF (pacientes com anemia falciforme, N=9), em condição basal e após estímulo com TNF- $\alpha$ . **(B)** Níveis de IL-8 dos sobrenadantes de cultura de BOECs Con (N=5), SS (pacientes AF sem HU, N=3); SSHU (pacientes AF em uso de HU, N=3); SStrf (pacientes AF em transfusão, N=3) em condição basal. \*P<0,05 comparado à BOEC Con basal; Teste de Mann-Whitney. <sup>Ø</sup>P<0,05 comparado à BOEC Con basal e ##P<0,01 comparado à BOEC AF basal; Teste de Wilcoxon. \*\*P<0,01 comparado à BOEC Con e #P<0,05 comparado à SStrf; Teste de Kruskal Wallis seguido do Teste de Dunn.

Em condição basal, não houve diferença significativa dos níveis de GM-CSF, MCP-1, IL-6, CCL-5 e ET-1, quando comparados os sobrenadantes de BOECs Con e BOECs AF. Porém, após o estímulo inflamatório, as BOECs AF apresentaram um aumento significativo nas dosagens de GM-CSF, MCP-1, IL-6 e CCL-5 em relação ao seu estado basal, e as BOECs Con, de GM-CSF e MCP-1, quando comparados à condição basal. (Figuras 21 A, B, C, D e E).

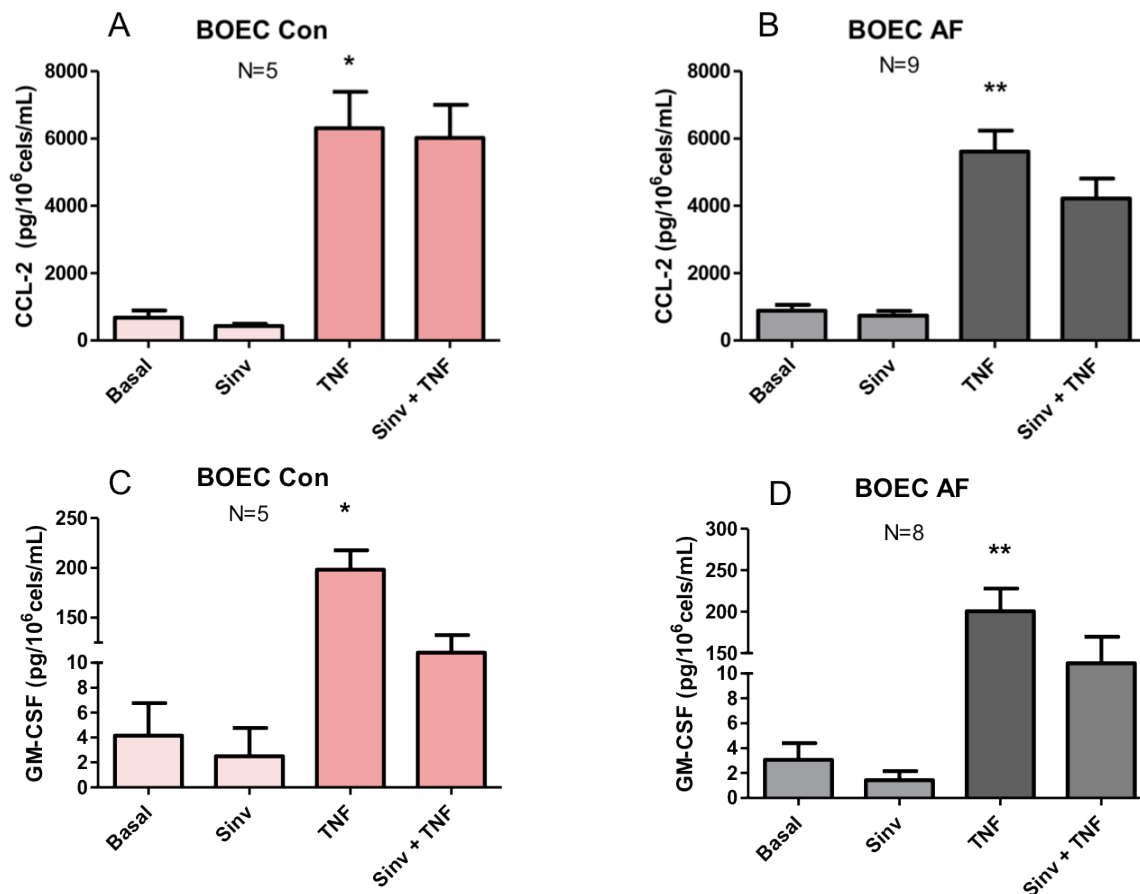


**Figura 21.** Níveis de mediadores inflamatórios nos sobrenadantes de culturas de indivíduos-controle (BOEC Con, N=5) e de pacientes com anemia falciforme (BOEC AF, N=9), na presença ou ausência de TNF- $\alpha$ (10ng/mL, 3h, 37<sup>0</sup>C, CO<sub>2</sub>). **(A)** GM-CSF; **(B)** CCL-2; **(C)** IL-6; **(D)** CCL-5 e **(E)** ET-1. \*P<0,05 comparado à BOEC Con basal; ##P<0,01 comparado à BOEC AF basal. Teste de Wilcoxon.

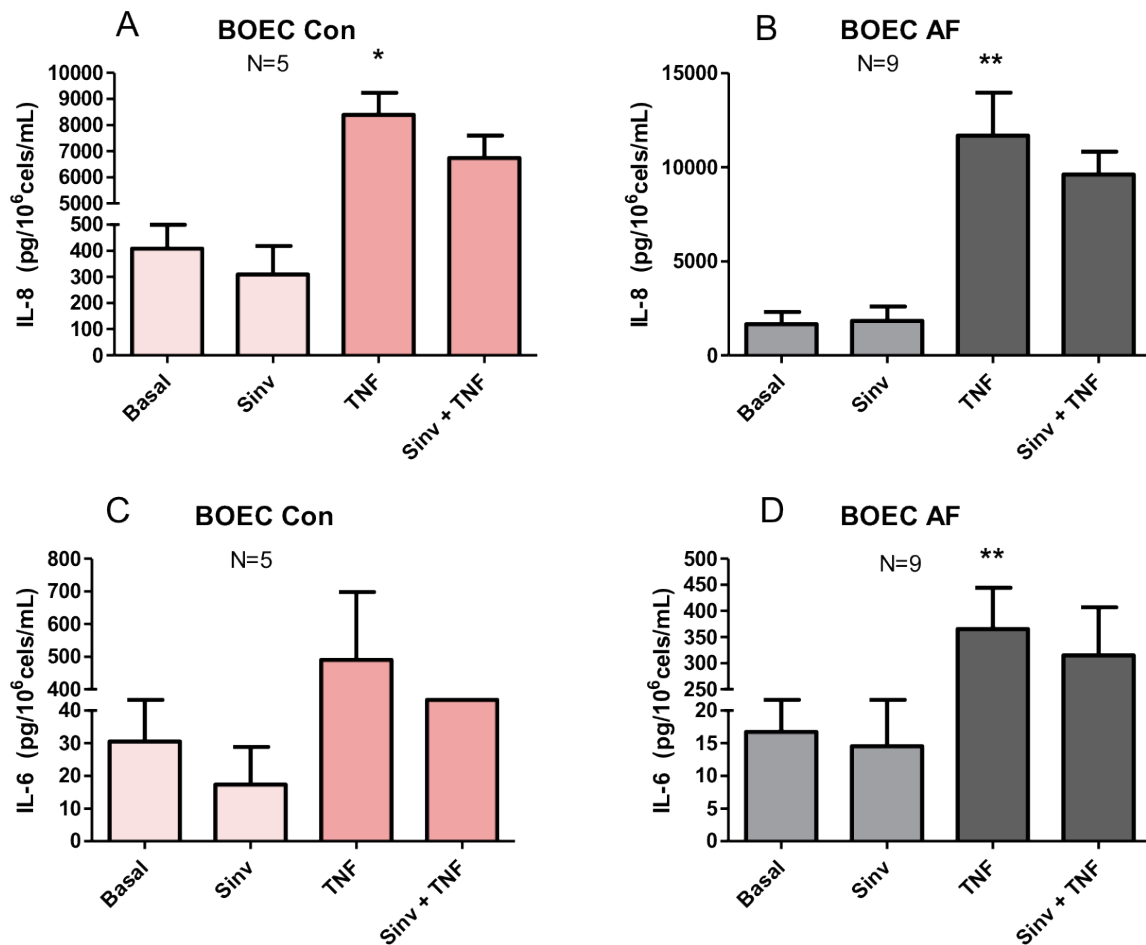
Em relação aos tratamentos realizados nas células com TNF- $\alpha$  e/ou sinvastatina, as figuras 20, 21, 22, 23 e 24 mostram que a citocina TNF- $\alpha$  agiu sobre as BOECs de Con e de AF, estimulando-as a produzirem e secretarem mais mediadores inflamatórios para o sobrenadante da cultura de células. A sinvastatina apresentou um papel anti-inflamatório sobre as BOECs AF para alguns mediadores inflamatórios, pois houve uma redução significativa dos níveis de ET-1 quando comparado ao estado basal e diminuição de CCL-5, quando as BOECs AF foram tratadas com TNF- $\alpha$  e sinvastatina (Figuras 22 B e D). A sinvastatina não teve efeito sobre as BOECs Con (Figuras 22 A e C, Figuras 23 A e C, Figuras 24 A e C).



**Figura 22.** Níveis de CCL-5 e ET-1 dos sobrenadantes de cultura coletados após incubação do meio de cultura por 3h30 min, 37<sup>0</sup>C, 5% CO<sub>2</sub>, tratamentos com sinvastatina (Sinv, 10μM, 3h e 30min, 37<sup>0</sup>C, 5%CO<sub>2</sub>) e/ou na presença de TNF-α (10ng/mL, 3h, 37<sup>0</sup>C, 5%CO<sub>2</sub>) nos sobrenadantes de cultura. **(A)** CCL-5 de BOECs Con (indivíduos-controle); **(B)** CCL-5 de BOECs AF (pacientes com anemia falciforme); **(C)** ET-1 de BOEC Con; **(D)** ET-1 de BOEC AF. \*P<0,05 e \*\*P<0,01 comparado à condição basal das células; ⊗P<0,05 comparado à BOEC AF + TNF. Teste de Friedman seguido do Teste de Dunn.



**Figura 23.** Níveis de CCL-2 e GM-CSF dos sobrenadantes de cultura coletados após incubação do meio de cultura por 3h30 min, 37<sup>0</sup>C, 5% CO<sub>2</sub>, tratamentos com sinvastatina (Sinv, 10μM, 3h e 30min, 37<sup>0</sup>C, 5%CO<sub>2</sub>) e/ou na presença de TNF-α (10ng/mL, 3h, 37<sup>0</sup>C, 5%CO<sub>2</sub>) nos sobrenadantes de cultura. **(A)** CCL-2 de BOEC Con (indivíduos-controle); **(B)** CCL-2 de BOEC AF (pacientes com anemia falciforme); **(C)** GM-CSF de BOEC Con; **(D)** GM-CSF de BOEC AF. \*P<0,05 e \*\*P<0,01 comparado à condição basal das células. Teste de Friedman seguido do Teste de Dunn.



**Figura 24.** Níveis de IL-8 e IL-6 dos sobrenadantes de cultura coletados após: incubação do meio de cultura por 3h30 min, 37<sup>0</sup>C, 5% CO<sub>2</sub>, tratamentos com sinvastatina (Sinv, 10μM, 3h e 30min, 37<sup>0</sup>C, 5%CO<sub>2</sub>) e/ou na presença de TNF-α (10ng/mL, 3h, 37<sup>0</sup>C, 5%CO<sub>2</sub>) nos sobrenadantes de cultura. **(A)** IL-8 de BOEC Con (indivíduos-controle); **(B)** IL-8 de BOEC AF (pacientes com anemia falciforme); **(C)** GM-CSF de BOEC Con; **(D)** IL-6 de BOEC AF; **(E)** IL-6 de BOEC Con; **(F)** IL-8 de BOEC AF; **(C)** IL-6 de BOEC Con; **(D)** IL-6 de BOEC AF \*P<0,05 e \*\*P<0,01 comparado à condição basal das células. Teste de Friedman seguido do Teste de Dunn.

#### 4.7 Expressão de genes relacionados ao sistema endotelial

Para o estudo de expressão gênica das BOECs foi realizada primeiramente uma triagem de genes por *PCR Array*, um método que permitiu analisar 84 genes simultaneamente. A placa *Human Endothelial Cell Biology RT<sup>2</sup> Profiler™ PCR Array* (Qiagen, Maryland, EUA) foi escolhida por conter genes do sistema endotelial, os quais estavam relacionados à inflamação, adesão celular, vasodilatação e vasoconstrição, coagulação, ativação plaquetária, angiogênese e apoptose. A expressão gênica foi avaliada nas BOECs isoladas de 3 indivíduos-controle, 3 pacientes AF sem uso de HU, 3 pacientes AF em terapia com HU e 3 pacientes AF em transfusão regular, em condição basal ou após estímulo com TNF- $\alpha$  (10ng/mL, 3h, 37<sup>0</sup>C) das células. Para cada BOEC de determinado indivíduo foi realizada uma placa de *PCR array*.

A Tabela 7 resume os genes detectados diferencialmente superexpressos (*FAS*, *TIMP1* e *SOD1*) ou subexpressos (*CCL2*, *SELE*, *WVF*) em determinados grupos de BOECs com anemia falciforme em relação às BOECs de indivíduos-controle em estado basal. A Tabela 8, mostra os genes superexpressos (*IL6*, *IL11*, *FAS* e *TIMP1*) ou subexpressos (*PECAM1* e *PTGIS*) após estímulo com TNF- $\alpha$ . Os resultados foram apresentados em *fold change*, isto é, quantas vezes mais ou menos as BOECs de pacientes expressaram em relação às BOECs de controle.

**Tabela 7.** Sumário de genes identificados como significativamente alterados nas BOECs de pacientes com anemia falciforme em relação às BOECs de indivíduos-controle em estado basal, detectados por PCR *array*.

| Genes                           | Diferença de <i>fold change</i> em relação à BOEC Con |                    |                     |
|---------------------------------|-------------------------------------------------------|--------------------|---------------------|
|                                 | BOEC SS<br>(N=3)                                      | BOEC SSHU<br>(N=3) | BOEC SStrf<br>(N=3) |
| Inflamação                      |                                                       |                    |                     |
| <i>CCL2</i>                     | –                                                     | –                  | ↓ 0,1908*           |
| Apoptose                        |                                                       |                    |                     |
| <i>FAS</i>                      | –                                                     | –                  | ↑ 329,2933**        |
| Adesão                          |                                                       |                    |                     |
| <i>SELE</i>                     | ↓ 0,0528**                                            | ↓ 0,1919**         | ↓ 0,489*            |
| <i>PECAMI</i>                   |                                                       | ↓ 0,2916*          |                     |
| Angiogênese                     |                                                       |                    |                     |
| <i>TIMPI</i>                    | –                                                     | –                  | ↑ 86,9922*          |
| Ativação<br>plaquetária         |                                                       |                    |                     |
| <i>VWF</i>                      | –                                                     | ↓ 0,0976*          | –                   |
| Vasodilatação<br>Vasoconstrição |                                                       |                    |                     |
| <i>SOD1</i>                     | ↑ 1,4715                                              | -                  | -                   |

BOEC SS: pacientes AF sem HU, BOEC SSHU: pacientes AF com HU, BOEC SStrf: pacientes AF em transfusão regular. (↑) genes superexpressos; (↓) genes subexpressos.  
\*P<0,05 e \*\*P<0,01 comparado à BOEC Con. Teste t de Student.

**Tabela 8.** Sumário de genes identificados como significativamente alterados nas BOECs de pacientes com anemia falciforme em relação às BOECs de indivíduos-controle após estímulo com TNF- $\alpha$ , detectados por PCR *array*.

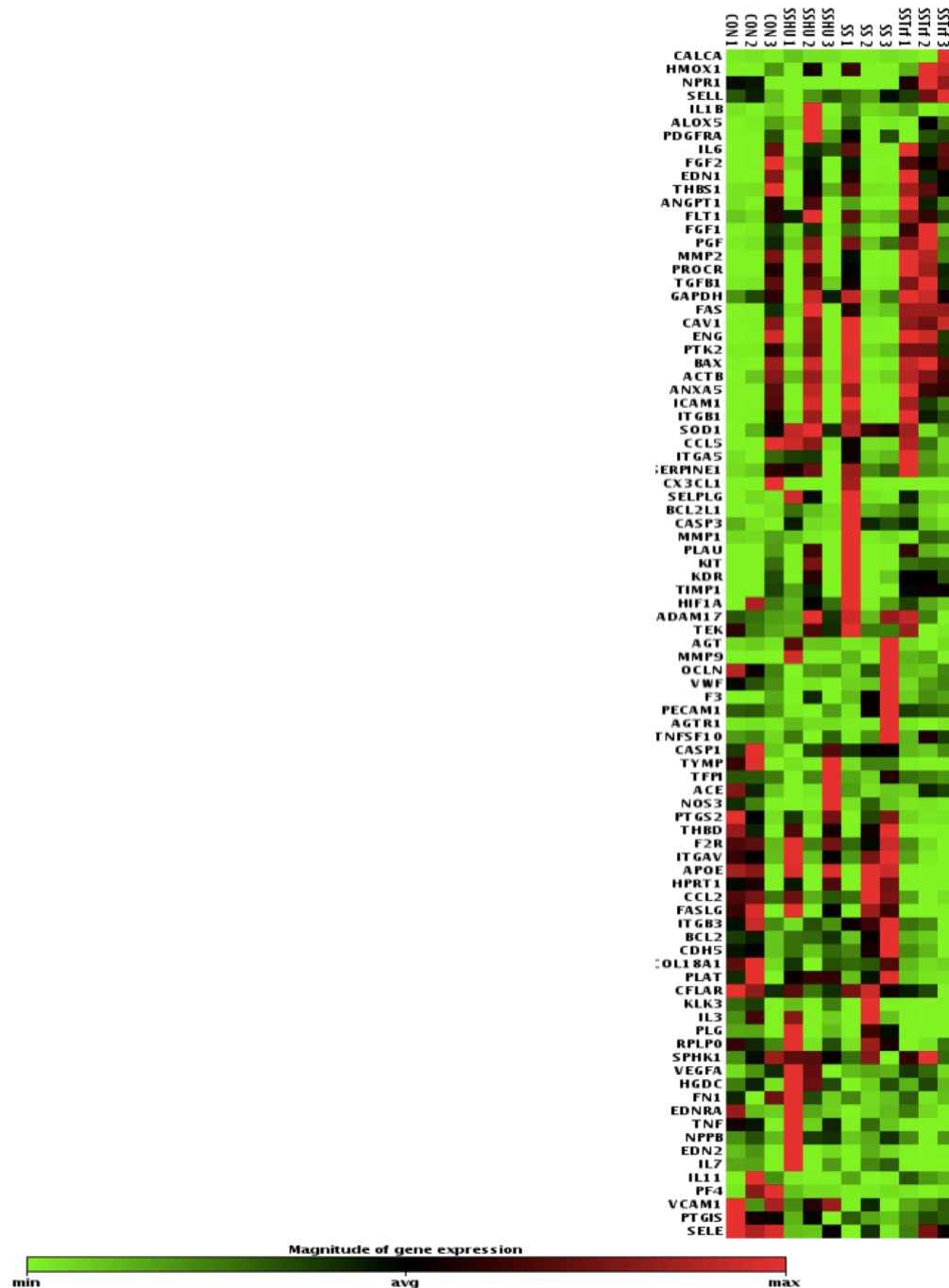
|                                 | <b>Diferença de <i>fold change</i> em relação à BOEC Con</b> |                            |                             |
|---------------------------------|--------------------------------------------------------------|----------------------------|-----------------------------|
| <b>Genes</b>                    | <b>BOEC SS<br/>(N=3)</b>                                     | <b>BOEC SSHU<br/>(N=3)</b> | <b>BOEC SSTrf<br/>(N=3)</b> |
| Inflamação                      |                                                              |                            |                             |
| <i>IL6</i>                      | –                                                            | –                          | ↑ 11,4454**                 |
| <i>IL11</i>                     | ↑ 20,1067*                                                   | -                          | -                           |
| Apoptose                        |                                                              |                            |                             |
| <i>FAS</i>                      | –                                                            | –                          | ↑ 410,1987**                |
| <i>PECAMI</i>                   |                                                              | ↓ -3,1363*                 |                             |
| Angiogênese                     |                                                              |                            |                             |
| <i>TIMPI</i>                    | –                                                            | –                          | ↑ 4,853*                    |
| Vasodilatação<br>Vasoconstrição |                                                              |                            |                             |
| <i>PTGIS</i>                    | ↓ -2,5244*                                                   | -                          | ↓ -2,0058*                  |
| <i>SOD1</i>                     | ↑ 1,5924*                                                    | ↑ 1,6264*                  | -                           |

BOEC SS: pacientes AF sem HU, BOEC SSHU: pacientes AF com HU, BOEC SSTrf: pacientes AF em transfusão regular. (↑) genes superexpressos; (↓) genes subexpressos.

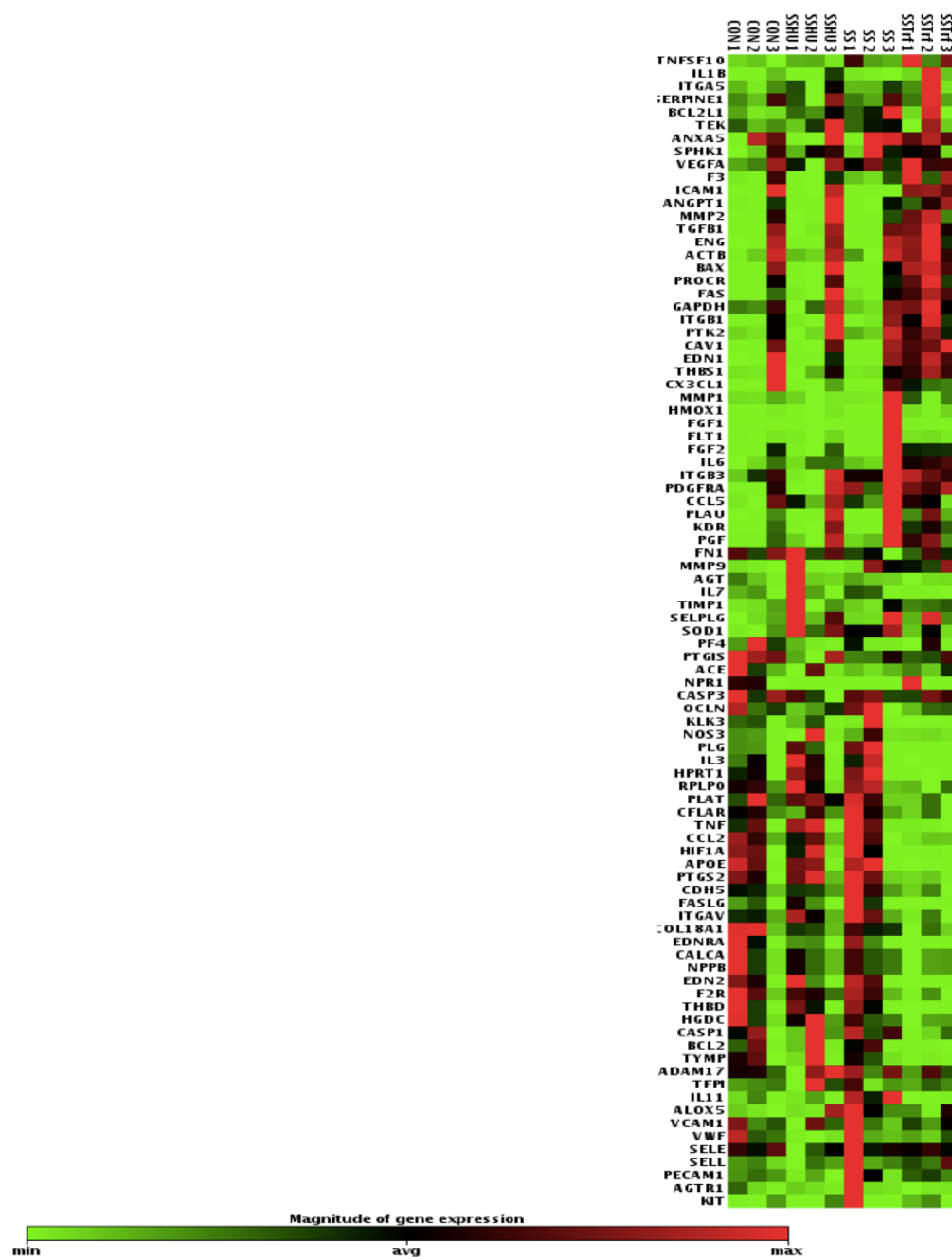
\*P<0,05 e \*\*P<0,01 comparado à BOEC Con. Teste t de Student.

Nos Apêndice 9.1 e 9.2 são apresentadas as tabelas contendo o perfil completo da expressão dos 84 genes detectados pela PCR *array* nas BOECs Con, SS, SSHU e SSTrf, em condição basal e após estímulo com TNF- $\alpha$  respectivamente. O Apêndice 9.3 mostra uma tabela com os genes que as BOECs AF apresentaram diferença significativa de expressão em relação às BOECs Con e o Apêndice 9.4 consta uma lista que contém os nomes completos dos genes analisados.

Os gráficos de clusterização (Figuras 25 e 26) mostram a expressão de cada gene para cada BOEC de indivíduo-controle e de paciente AF de acordo com a cor e intensidade de cor, podendo assim ser observada variação na expressão gênica entre as BOECs analisadas. Os Apêndice 9.5 e 9.6 apresentam gráficos de clusterização da expressão gênica, de acordo com os grupos de BOECs.



**Figura 25.** Gráfico de clusterização dos genes avaliados pelo PCR *array* de acordo com BOECs de indivíduos- controle (CON 1, CON 2, CON 3), pacientes AF sem uso de hidroxiureia (SS 1, SS 2, SS 3), pacientes AF em uso de hidroxiureia (SSHU 1, SSHU 2, SSHU 3), pacientes AF em transfusão regular (SSTRf 1, SSTRf 2, SSTRf 3). A cor vermelha denota maior expressão e a cor verde menor expressão gênica.

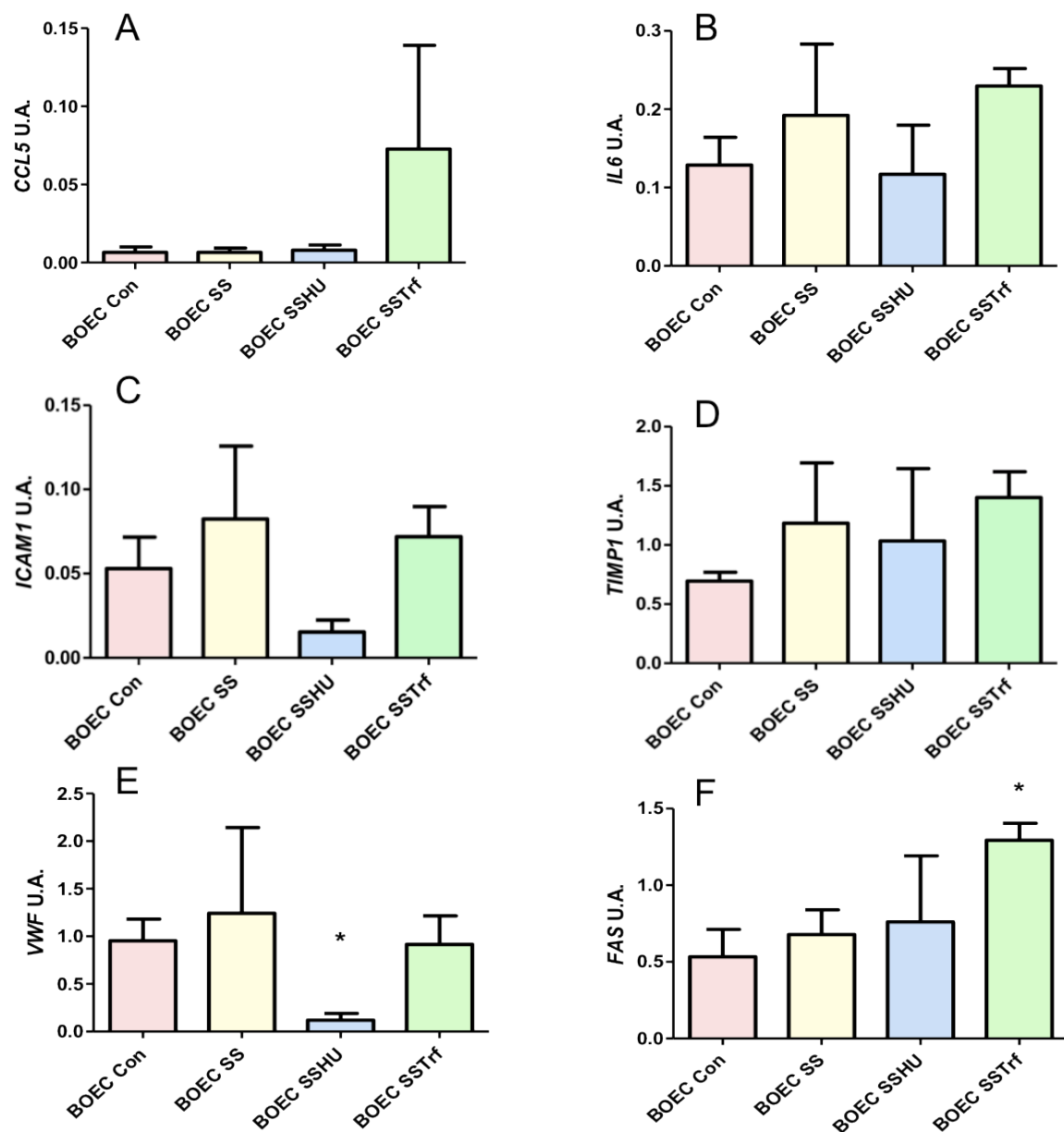


**Figura 26.** Gráfico de clusterização dos genes avaliados pelo PCRarray de acordo com BOECs de indivíduos- controle (CON 1, CON 2, CON 3), pacientes AF sem uso de hidroxiureia (SS 1, SS 2, SS 3), pacientes AF em uso de hidroxiureia (SSHU 1, SSHU 2, SSHU 3), pacientes AF em transfusão regular (SSTrf 1, SStrf 2, SStrf 3) após tratamento com TNF- $\alpha$  (10ng/mL, 3h, 37<sup>0</sup>C, 5%CO<sub>2</sub>). A cor vermelha denota maior expressão e a cor verde menor expressão gênica.

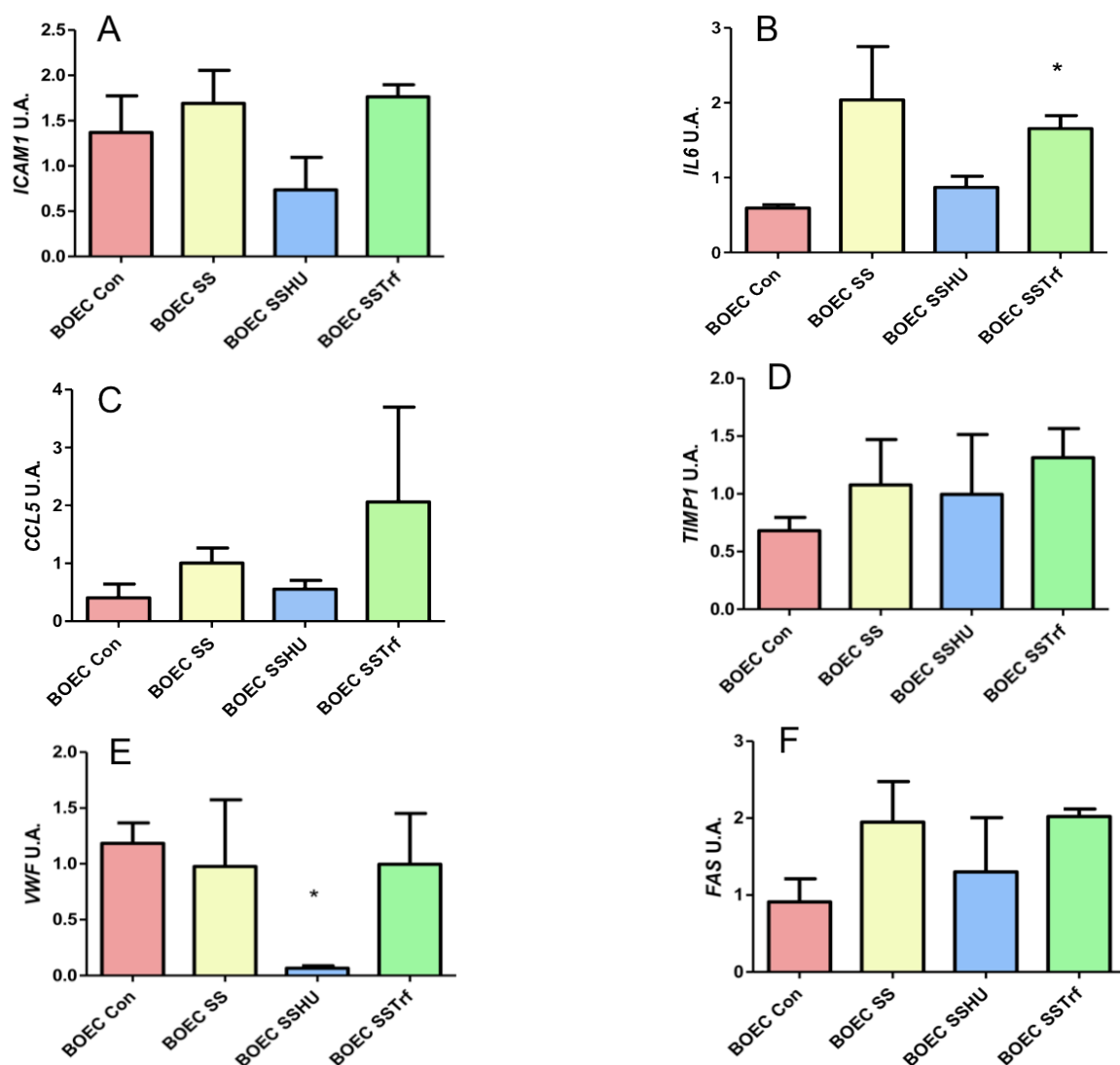
A partir dos resultados da PCR *array*, do ELISA e de citometria de fluxo, alguns genes foram selecionados para a validação dos resultados por qRT-PCR. Os genes que foram escolhidos estão relacionados à inflamação (*IL6* e *CCL5*), ativação plaquetária (*VWF*), adesão celular (*ICAM1*), angiogênese (*TIMP1*) e apoptose (*FAS*). A qPCR foi realizada nas BOECs de indivíduos-controle (N=4) e de pacientes com AF (N=3 de cada grupo), na mesma condição de basal e após tratamento com TNF- $\alpha$  10ng/mL, 3h, 37°C, 5%CO<sub>2</sub>).

Os resultados da expressão gênica por qPCR foram expressos em unidades arbitrárias (U.A.). Em condição basal, não houve diferença significativa de expressão dos genes *IL6* e *CCL5* nos grupos de BOECs de pacientes AF, em relação ao grupo de BOEC Con; porém foi observada subexpressão significativa de *VWF* em BOEC SSHU comparada à BOEC Con e superexpressão significativa de *FAS* em BOEC SSTrf em relação à BOEC Con, o perfil de expressão desses quatro genes foi o mesmo detectado pela PCR *array*. Além disso, as BOECs SSTrf tiveram superexpressão do gene *TIMP1* na PCR *array*, resultado este não observado pelo método de qPCR (Figuras 27 A-F).

As figuras 28 A-F mostram resultados da expressão gênica das BOECs após estímulo inflamatório com TNF. Assim como na PCR *array*, a técnica de qPCR detectou aumento de expressão significativa do gene *IL6* nas BOECs SSTrf quando comparada à BOEC Con. A redução de expressão significativa de *VWF* nas BOECs SSHU (em relação à BOEC Con) detectada por qPCR não foi encontrada na PCR *array*. As BOECs SSTrf apresentaram superexpressão dos genes *TIMP1* e *FAS*, quando comparadas à BOEC Con, determinada pela PCR *array*, mas não pela qPCR.



**Figura 27.** Perfil de expressão de genes endoteliais detectados por qPCR em BOECs: Con (indivíduos-controle, N=4), SS (pacientes AF sem HU, N=3), SSHU (pacientes AF com HU, N=3) e SSTrf (pacientes em transfusão regular, SSTrf, N=3). **(A)** *ICAM1*; **(B)** *IL6*; **(C)** *CCL5*; **(D)** *TIMP1*; **(E)** *FVW*; **(F)** *FAS*. \* $P < 0,05$  comparado à BOEC Con. Teste Kruskal Wallis, seguido do Teste de Dunn.



**Figura 28.** Perfil de expressão de genes endoteliais detectados por qPCR em BOECs: Con (indivíduos-controle, N=3), SS (pacientes AF sem HU, N=3), SSHU (pacientes AF com HU, N=3) e SStrf (pacientes em transfusão regular, N=3) após tratamento com TNF- $\alpha$  (10ng/mL, 3h, 37<sup>0</sup>C, 5%CO<sub>2</sub>). (A) *ICAM1*; (B) *IL6*; (C) *CCL5*; (D) *TIMP1*; (E) *FVW*; (F) *FAS*. \*P<0,05 comparado à BOEC Con. Teste Kruskal Wallis, seguido do Teste de Dunn.

# ***DISCUSSÃO***



## 5. DISCUSSÃO

Devido a grande variedade de funções que as células endoteliais exercem (manutenção do tônus vascular, hemostasia, participação na resposta inflamatória e no processo de angiogênese), a ativação, lesão ou disfunção endotelial dessas células podem contribuir em diversos mecanismos fisiopatológicos de doenças como aterosclerose, *diabetes* e hemoglobinopatias, incluindo a anemia falciforme (Conran e Costa, 2009)

Sabe-se que o endotélio tem participação importante na fisiopatologia da anemia falciforme, por sofrer ativação e disfunção endotelial, decorrente da hemólise intravascular e da inflamação crônica e por interagir com as células sanguíneas no processo vaso-oclusivo. Evidências indiretas, de que o endotélio vascular de pacientes AF poderia estar ativado, vêm de estudos utilizando as células endoteliais circulantes (CECs) de pacientes com AF. O nosso trabalho detectou aumento de número de CECs em pacientes AF assim como Solovey *et al.* (1997) e Strijbos *et al.* (2009) observaram níveis aumentados de CECs e relacionaram esse aumento à provável ativação do endotélio e da gravidade clínica dos pacientes AF, além disso, nos estudos de Solovey *et al.* (1997) e Solovey *et al.* (1998) foram detectados aumento de expressão das moléculas de adesão VCAM-1, ICAM-1, Selectina-E e de fator tecidual nas CECs de pacientes AF. Em nosso estudo, foram detectados níveis elevados de CECs no grupo de pacientes em uso de HU. Não há na literatura dados que relacionem o número de CECs com o tratamento de HU e não sabemos qual seria a ação desse medicamento sob o aumento dessas células na circulação, provavelmente os nossos resultados encontrados deve-se ao maior número de pacientes utilizados neste grupo de estudo (N=19), quando comparado ao de pacientes SS (N=5).

A cultura de BOEC foi estabelecida com o objetivo de servir como modelo de estudo *in vitro* do sistema endotelial de pacientes com AF. As BOECs possuem vantagens a

serem utilizadas em estudos como alta capacidade de proliferação, fenótipo de célula endotelial madura estável por várias passagens durante o cultivo e a possibilidade de utilizar tratamentos com drogas (Fuchs *et al.*, 2006; Lin, *et al.* 2000). No entanto, o estabelecimento da cultura é complexa, de longa duração e com 50% de sucesso de estabelecer culturas positivas para BOECs. Martin *et al.* (2012), recentemente publicaram um protocolo de cultura de BOEC com algumas modificações em relação ao que foi utilizado nesta pesquisa e que mostrou 80% de sucesso de cultura. Em nossa pesquisa, foi possível isolar BOECs de pacientes com anemia falciforme e de indivíduos saudáveis, utilizados como controle para comparação, de ambos os sexos feminino e masculino e numa faixa etária variada (20 a 57 anos). Assim como neste estudo, Stronceck *et al.* (2009) descreveram BOECs de proliferação limitada, observando que estas células são maiores e irregulares e apresentam positividade para a  $\beta$ -galactosidase, um marcador de senescência, mas não se sabe o porquê do aparecimento dessas células em algumas culturas.

As BOECs têm sido utilizadas em diversos estudos como modelo no estudo fisiopatológico da telangectasia hemorrágica hereditária, uma doença que cursa com anormalidades vasculares (Fernandez *et al.*, 2005); como fonte para detecção de possíveis diferenças genéticas relacionadas às células endoteliais e que assim podem contribuir no desenvolvimento de doenças vasculares (Milbauer *et al.*, 2008; Wei *et al.*, 2011); como veículo em abordagens terapêuticas, relacionadas à regeneração vascular (Critser e Yoder, 2010; Schwarz *et al.*, 2012); no transporte de genes como fator VIII ou de FvW relacionados ao tratamento de hemofilia A e da doença de von Willebrand respectivamente (Lin *et al.*, 2002; Matsui *et al.*, 2007; De Meyer *et al.*, 2006); na terapia anti-angiogênica de

tumores em modelos animais (Dudek *et al.*, 2007); como modelo de estudo em *diabetes* que apresenta problemas vasculares (Ingram *et al.*, 2008).

Além disso, o uso das BOECs resulta em outras vantagens, pois são as células que mais mimetizam as células endoteliais *in vivo* e são similares às células da microvasculatura (Jiang *et al.*, 2007). Além disso, a utilização das BOECs de pacientes com AF permitiu avaliar as propriedades adesivas e inflamatórias das células sem a interferência do ambiente inflamatório e da vaso-oclusão encontrada *in vivo*.

A padronização da cultura de BOEC em pacientes com AF iniciou-se com a utilização de amostras daqueles que faziam transfusão sanguínea regular em consequência da gravidade clínica que esses pacientes apresentam. Neste caso, o sangue proveniente da sangria terapêutica que seria descartado, foi utilizado para a cultura. Diante disso, uma vez estabelecida a cultura, tentou-se a realização dessa cultura dos pacientes com AF que eram estáveis e daqueles que estavam em uso de hidroxiureia.

Os resultados do ensaio de adesão estática mostraram que em condição basal houve aumento significativo de adesão das hemácias de indivíduos-controle em BOECs de pacientes AF sugerindo assim que as BOECs desses pacientes possam apresentar propriedades anormais independentemente do ambiente de vaso-oclusão e de inflamação crônica observada no paciente com AF.

Após estímulo inflamatório com TNF- $\alpha$ , houve maior adesão de hemácias de indivíduos-controle e de pacientes AF nas BOECs quando comparadas aos resultados de adesão em condição basal, porém sem diferença significativa entre as BOECs Con e AF, sugerindo que as BOECs de pacientes AF, em seu estado basal já estão ativadas, isto é, com propriedades adesivas significativamente aumentadas. O estímulo com TNF- $\alpha$

aparentemente não provoca incremento significativo nessa ativação o que explicaria a não variabilidade da adesão celular. e que não são mais vistas após um estímulo inflamatório externo.

As hemácias SS apresentaram uma adesão significativamente maior, quando comparadas aos grupos de hemácias Con e SSHU e os resultados desse aumento foram similares em BOEC Con e BOEC AF, como esperado de acordo com dados da literatura que demonstram adesão anormal das hemácias SS em diversos tipos de células endoteliais *in vitro*, como células endoteliais de linhagem de cordão umbilical humano (Hebbel *et al.*, 1980, Walmet *et al.*, 2003) e células endoteliais cultivadas a partir da artéria pulmonar bovina (Space *et al.*, 2000). As hemácias de pacientes AF, em terapia com HU (He SSHU), tiveram uma tendência a aderirem menos às BOECs, quando comparadas à adesão das He SS. Estudos mostraram menor adesão das He SSHU *in vitro* à fibronectina (Gambero *et al.*, 2007), à laminina e à trombospondina (Hillery, 2000).

Diante dos resultados de adesão, utilizando as BOECs, sugere-se que as BOECs de pacientes AF possam ter propriedades adesivas anormais mesmo *in vitro*, devido ao aumento encontrado da adesão de hemácias de indivíduos-controles, isto é, de hemácias que não possuem alteração em sua forma e na constituição da membrana. Para tentar entender por qual mecanismo esse aumento ocorreu, avaliaram-se as moléculas de adesão que estão presentes na superfície das células endoteliais e que são importantes na adesão eritrocitária.

As BOECs Con e AF não apresentaram diferenças significativas na expressão de moléculas de adesão VCAM-1, ICAM-1, Selectinas P e E, CD36, Lu/BCAM e integrina  $\alpha_v\beta_3$ , analisada tanto em porcentagem de células quanto em média de intensidade de

fluorescência. Não há na literatura dados de citometria de fluxo quanto à expressão de moléculas de adesão de BOECs de pacientes AF. Stronceck et al. (2009) detectaram aumento de MIF da integrina  $\alpha_v\beta_3$  nas BOECs de pacientes com doença cardiovascular, quando comparada à MIF de BOEC de indivíduos saudáveis. As integrinas são conhecidas por mediar alterações nas propriedades adesivas. Essas alterações são causadas pela mobilização dessas moléculas de adesão na superfície celular, (Sims e Dustin, 2002) pela mudança na afinidade (ShimaokaI *et al.*, 2002) e avides da integrina (Hogg e Leitinger, 2001). Desse modo, é possível que o aumento das propriedades adesivas, observado nas BOECs de pacientes AF, possa ser mediado pela alteração na afinidade das integrinas e não por alterações da expressão na superfície celular. No entanto, os mecanismos que envolvem outras moléculas de adesão precisam ser estudados para melhor compreensão do aumento da adesão em BOECs de pacientes AF.

Os processos vaso-oclusivos na microcirculação, infecções e hemólise são importantes fatores que estimulam a produção de citocinas e proteínas de fase aguda. As citocinas participam de vários mecanismos que podem contribuir para o processo de vaso-oclusão na anemia falciforme, incluindo ativação do endotélio, indução da adesão dos leucócitos e células vermelhas ao endotélio, ativação de plaquetas, produção de endotelina-1 e alteração na apoptose endotelial (Makis *et al.*, 2000). Sendo assim, para avaliar as propriedades inflamatórias das BOECs, além da detecção da expressão das moléculas de adesão, foram feitas dosagens de citocinas inflamatórias como: GM-CSF, IL-8, IL-6, MCP-1, CCL-5 e ET-1 nos sobrenadantes de culturas de BOECs de indivíduos-controle e de pacientes com AF e EH.

Os níveis de IL-8, em condição basal, foram significativamente maiores nos sobrenadantes das culturas de pacientes AF, comparados aos de BOECs Con, e esse aumento foi às custas da produção dessa citocina pelas BOECs SS. A IL-8 é produzida por células endoteliais e por leucócitos em regiões de inflamação, tendo a sua produção regulada por IL-1 e TNF. Os níveis elevados de IL-8 no plasma de pacientes AF já foram detectados (Pathere *et al.*, 2004; Lanaro *et al.*, 2009) e essa citocina está associada ao início do processo de vaso-oclusão e na manutenção da inflamação crônica na AF por desempenhar funções de quimioatrair neutrófilos, mediar a inflamação e induzir maior adesão das hemácias SS ao endotélio (Makis *et al.*, 2000). As dosagens dos demais mediadores não apresentaram diferenças significativas entre BOECs Con e AF. Este é o primeiro estudo que determinou a produção de mediadores inflamatórios de BOECs de pacientes com AF. Zhang *et al.* (2009) detectaram a capacidade das BOECs de indivíduos saudáveis de liberarem mediadores pró-inflamatórios e pró-coagulantes. Os resultados obtidos em nosso trabalho, sugerem que as BOECs de pacientes com AF têm uma tendência à atividade pró-inflamatória mesmo *in vitro* após cultura, pois, no estado basal foi observado uma maior produção de IL-8; uma citocina que pode contribuir para o estado inflamatório crônico observado nesses pacientes. Todas as BOECs de pacientes e de indivíduos-controle demonstraram ser vulneráveis ao ambiente inflamatório *in vitro*, o TNF- $\alpha$  induziu a uma maior produção dos mediadores avaliados. A sinvastatina, uma droga anti-inflamatória pareceu agir sobre as células endoteliais, pois houve redução significativa nos níveis de ET-1, nos sobrenadantes de BOEC AF quando comparados ao estado basal das células e de CCL-5 nas BOECs AFs estimuladas com TNF- $\alpha$ .

Outro modo para avaliarmos as propriedades adesivas e inflamatórias nas BOECs foi por meio da detecção da expressão de genes endoteliais. Realizou-se uma triagem de genes utilizando a PCR *array* (Qiagen). Vários genes detectados nas BOECs de pacientes AF foram superexpressos ou subexpressos mas sem significância estatística, quando comparados às BOECs Con, tanto em condição basal ou após estímulo inflamatório. As BOECs de pacientes AF, de acordo com o grupo, apresentaram perfis de expressão gênica variados em comparação com a BOEC Con, e por outro lado, as BOECs SSTrf foram as que tiveram mais genes diferencialmente expressos em relação às BOECs SS e SSHU. De uma forma geral, dentre os 84 genes analisados, foram identificados dez genes com diferença estatisticamente significativa de expressão: *CCL2* (↓), *IL6* (↑), *IL11* (↑), *FAS* (↑), *PTGIS* (↓), *SELE* (↓), *SOD1* (↑), *TIMP1* (↑), *VWF* (↓), *PECAM* (↓). Esses genes estão relacionados à inflamação (*CCL2*, *IL6*, *IL11*), apoptose (*FAS*), adesão celular (*SELE*, *PECAM*, *VWF*), angiogênese (*TIMP1*), vasoconstrição/vasodilatação (*PTGIS*, *SOD1*), ativação plaquetária (*VWF*). A regulação desses genes são todos importantes para a manutenção da homeostase. As diferenças de expressão desses genes detectadas nas BOECs AF em relação às BOECs Con não explicam as propriedades adesivas e inflamatórias encontradas alteradas nas BOECs dos pacientes.

Alguns genes significativamente super ou subexpressos detectados por PCR *array* como *IL6*, *FAS*, *VWF*, *TIMP1*, foram selecionados para a confirmação dos resultados, pelo método de qPCR. Os genes *ICAM1*, *IL6*, *CCL2* e *CCL5* foram escolhidos para fazer correlação com a expressão proteica, detectada por citometria de fluxo ou pela dosagem proteica por ELISA. Os perfis de expressão gênica, detectados nas BOECs de pacientes com AF por qPCR dos genes *IL6*, *VWF*, *FAS* e *CCL5* foram confirmados, pois, foram

encontrados os mesmos resultados por PCR *array*. No entanto, o resultado de *TIMP1* não coincidiu entre as duas técnicas. As BOECs AF não apresentaram diferença de expressão gênica de *ICAM1*, ou de expressão proteica quando comparada à BOEC Con. As BOECs SSTRf tiveram maior expressão gênica de *CCL2* em condição basal e de *IL6* após estímulo inflamatório; porém, dosagens proteicas aumentadas de CCL-2 (MCP-1) e de IL-6 por ELISA não foram detectadas para essas células (dados não mostrados). Assim, os resultados apresentados mostram que o aumento ou a diminuição da expressão gênica podem não corresponder respectivamente à proteína que codifica.

Diante dos dados obtidos, as BOECs demonstraram ser um bom modelo de estudo *in vitro* de AF. De acordo com os resultados da adesão estática celular, sugere-se que as BOECs dos pacientes tenham propriedades adesivas anormais que são mantidas mesmo *in vitro*, pois foi detectado um aumento de adesão de hemácias normais nas BOECs AF. O mecanismo responsável por esse fato não foi completamente esclarecido com a metodologia utilizada neste trabalho.

É importante mencionar que esse modelo indicou que as BOECs dos pacientes retêm sua capacidade pró-inflamatória mesmo após a cultura. Também nesse caso, o mecanismo causal necessita ser completamente esclarecido.

Em seu conjunto, os dados desse trabalho mostram pela primeira vez na literatura que células endoteliais de pacientes com anemia falciforme possam ter propriedades adesivas e inflamatórias anormais mesmo fora do ambiente da circulação do paciente com AF onde existe vaso-oclusão e inflamação crônica. Esses resultados necessitam ser confirmados em estudos com maior número de pacientes e em outras doenças falciformes, no entanto, abrem uma nova perspectiva para o esclarecimento da fisiopatologia da anemia falciforme e podem contribuir para o estudo de novas terapias para essa doença.

# ***CONCLUSÃO***



## 6. CONCLUSÃO

- Esta pesquisa confirmou a possibilidade de se estabelecer a cultura de BOECs de pacientes com anemia falciforme e de indivíduos saudáveis.

- Trata-se do primeiro estudo a avaliar as propriedades adesivas de BOECs na anemia falciforme, e os resultados sugerem que as BOECs de pacientes com AF, após a sua cultura *in vitro*, possuem propriedades intrínsecas e anormais que promovem o aumento de adesão de hemácias normais provenientes de indivíduos saudáveis;

- As moléculas de adesão não foram diferencialmente expressas entre as BOECs de pacientes com anemia falciforme e BOECs de controle.

- As BOECs de pacientes com anemia falciforme apresentaram níveis significativamente elevados da citocina inflamatória IL-8, sugerindo um fenótipo pró-inflamatório *in vitro*, isto é, na ausência da vaso-oclusão e inflamação crônica encontradas na doença falciforme.

- A variabilidade de expressão gênica identificada nas BOECs de pacientes com anemia falciforme não explica as propriedades adesivas e inflamatórias dessas células endoteliais.

- Diante dos dados obtidos, as BOECs demonstraram ser um bom modelo de estudo *in vitro* de AF e que abrem uma nova perspectiva para contribuir no estudo de novas terapêuticas e na fisiopatologia da anemia falciforme.



# ***REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS***



## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abelda SM, Buck CA. Integrin and other cell adhesion molecules. **FASEB J.** 1990;4:2868-80.

Aird WC. Phenotypic heterogeneity of the endothelium: I. Structure, function, and mechanisms. **Circ Res.** 2007;100:158-73.

Araújo A, Drelichman G, Cançado RD, Watman N, Magalhães SM, Duhalde M *et al.* Latin American Experts Panel. Management of transfusional iron overload in Latin America: current outlook and expert panel recommendations. **Hematology.** 2009;14(1):22-32.

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.** 1997;275:964-67.

Aslan M, Ryan TM, Adler B, Townes TM, Parks DA, Thompson JA *et al.* Oxygen radical inhibition of nitric oxide-dependent vascular function in sickle cell disease. **PNAS.** 2001; 26(98):15215-20.

Au P, Daheron LM, Guda DG, Cohen KS, Tyrrell JA, Lanning MR *et al.* Differential in vivo potential of endothelial progenitor cells from human umbilical cord blood and adult peripheral blood to form functional long-lasting vessels. **Blood.** 2008;111:1302-05.

Belcher JD, Mahaseth H, Welch TE, Vilback AE, Sonbol KM, Kalambur VS *et al.* Critical role of endothelial cell activation in hypoxia-induced vasoocclusion in transgenic sickle mice. **Am J Physiol Heart Circ Physiol.** 2005; 288:H2715-25.

Blei F, Fancher T, Guarini L. Elevated levels of circulating molecules of potential endothelial origins in sickle cell disease. **Blood.** 1994;84; Suppl1:409a.abstract.

Canalli AA, Proença RF, Franco-Penteado CF, Traina F, Sakamoto TM, Saad STO *et al.*

Participation of Mac-1, LFA-1 and VLA-4 integrins in the in vitro adhesion of sickle cell disease neutrophils to endothelial layers, and reversal of adhesion by simvastatin. **Haematologica**. 2011;96(4):526-33.

Canalli AA, Conran N, Fattori A, Saad ST, Costa FF. Increased adhesive properties of eosinophils in sickle cell disease. **Exp Hematology**. 2004;32(8):728-34.

Cardoso GL, Guerreiro JF. African gene flow to north Brazil as revealed by HBB\*S gene haplotype analysis. **Am J Hum Biol**. 2006;18(1):93-8.

Cartron JP, Elion J. Erythroid adhesion molecules in sickle cell disease: effect of hydroxyurea. **Transfusion Clinique et Biologique**. 2008;15:39-50.

Charache S, Terrin ML, Moore MD, Dover GJ, Barton FB, Eckert SV et al. Effect of hydroxyurea on frequency of painful crises in sickle cell anemia. **N Engl J Med**. 1995;332:1317-22.

Cokic VP, Smith RD, Beleslin-Cokic BB, Njoroge JM, Miller JL Gladwin MT et al. Hydroxyurea induces fetal hemoglobin by the nitric oxide-depend activation of soluble guanylyl cyclase. **J Clin Invest**. 2003;111(2): 231-9.

Conran N.; Costa F.F. Hemoglobin disorders and endothelial cell interactions. **Clinical Biochemistry**. 2009;42:1824-38.

Conran N, Saad ST, Costa FF, Ikuta T. Leukocyte numbers correlate with plasma levels of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in sickle cell disease. **Ann. Hematol**. 2007;86:255–61.

Costa FF. Anemia Falciforme. In: Zago MA, Falcão RP, Pasquini R. **Hematologia Fundamentos e Prática**. São Paulo: Ed. Atheneu, 2004, Cap. 30, p. 289-308.

Critser PJ, Yoder MC. Endothelial colony-forming cell role in neoangiogenesis and tissue repair. **Curr Opin Organ Transplant**. 2010;15:68-72.

Croizat H. Circulating cytokines in sickle cell patients during steady state. **Br J Haematol**. 1994;87:592-7.

Cross MJ, Dixelius J, Matsumoto T, Claesson-Welsh L. VEGF-receptor signal transduction. **Trends Biochem Sci**. 2003;28:488-94.

Dejana E, Corada M, Lampugnani MG. Endothelial cell-to-cell junctions. **FASEB J**. 1995;9:910-8.

De Meyer SF, Vanhoorelbeke K, Chuah MK, Pareyn I, Gillijns V, Hebbel RP *et al*. Phenotypic correction of von Willebrand disease type 3 blood-derived endothelial cells with lentiviral vector expressing von Willebrand factor. **Blood**. 2006; 107:4728-36.

Diomedede L, Albani D, Sottocorno D, Donati M, Bianchi MB, Fruscella P. In vivo anti-inflammatory effect of statins is mediated by nonsterol mevalonate products. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**. 2001;21:1327-32.

Dossou-Yovo OP, Zaccaria I, Benkerrou M, Hauchecorne M, Alberti C, Rahimy MC *et al*. Effects of RANTES and MBL2 gene polymorphisms in sickle cell disease clinical outcomes: association of the g.In1.1T>C RANTES variant with protection against infections. **Am J Hematol**. 2009;84(6):378-80

Dudek AZ, Bodempudi V, Welsh BW, Jasinski P, Griffin RJ, Milbauer L *et al*. Systemic inhibition of tumour angiogenesis by endothelial cell-based gene therapy. **Br. J. Cancer**. 2007; 97: 513-22.

El Nemer W. Role of Lu/BCAM in abnormal adhesion of sickle red blood cells to vascular endothelium. **Transf Clin Biol**. 2008;15:29-33.

Fernandez LA, Sanz-Rodriguez F, Zarrabeitia R, Pérez-Molino A, Hebbel RP, Nguyes J *et al.* Blood outgrowth endothelial cells from hereditary haemorrhagic telangiectasia patients reveal abnormalities compatible with vacular lesions. **Cardiovasc Res.** 2005;68:235-48.

Fuchs S, Hermanns MI, Kirkpatrick CJ. Retention of a differentiated endothelial phenotype by outgrowth endothelial cells isolated from human peripheral blood and expanded in long-term cultures. **Cell Tissue Res.** 2006;326:79–92.

Galley HF, Webster NR. Physiology of the endothelium. **Br J Anaesth.** 2004;93:105-13.

Gambero S, Canalli AA, Traina F, Albuquerque DM, Saad ST, Costa FF *et al.* Therapy with hydroxyurea is associated with reduced adhesion molecule gene and protein expression in sickle red cells with a concomitant reduction in adhesive properties. **Eur J Hematol.** 2007; 78: 144-51.

Gladwin MT, Schechter AN. "Nitric oxide therapy in sickle cell disease." **Semin Hematol .** 2001;38(4):333-42.

Gladwin MT, Shelhamer JH, Ognibene FP, Pease-Fye ME, Nichols JS, Link B *et al.* Nitric oxide donor properties of hydroxyurea in patients with sickle cell disease. **Br. J. Haematol.** 2002;116:436–44.

Goon PKY, Lip GYH, Boos CJ, Stonelake PS, Blann AD. Circulating endothelial cells, endothelial progenitor cells, and endothelial microparticles in cancer. **Neoplasia.** 2006;8(2):79-88.

Graido-Gonzalez E, Doherty JC, Bergreen EW, Organ G, Telfer M, McMillen MA. Plasma endothelin-1, cytokine, and prostaglandin E<sub>2</sub> levels in sickle cell disease and acute vaso-occlusive sickle crisis. **Blood.** 1998;92(7):2551-55.

Gulati R, Jevremovic D, Peterson TE, Chatterjee S, Shah V, Vile RG, Simari RD. Diverse origin and Function of Cells with Endothelial Phenotype Obtained from Adult Human Blood. **Cir Res**. 2003;93:1023-5.

Halsey C, Roberts IA. The role of hydroxyurea in sickle cell disease. **Br J Haematol**. 2003;120(2):177-86.

Hebbel RP, Osarogiagbon R, Kaul D. The Endothelial biology of sickle cell disease: inflammation and a chronic vasculopathy. **Microcirculation**. 2004;11: 129-51.

Hebbel RP; Vercellotti GM. The endothelial biology of sickle cell disease. **J Lab Clin Med**. 1997;129(3):288-93.

Hebbel RP, Yamada O, Moldow CF, Jacob HS, White JG, Eaton JW. Abnormal adherence of sickle erythrocytes to cultured vascular endothelium: possible mechanism for microvascular occlusion in sickle cell disease. **J Clin Invest**. 1980;65(1):154-60.

Hebbel RP, Schwartz RS, Mohandas N. The adhesive sickle erythrocyte: Cause and consequence of abnormal interactions with endothelium, monocytes/macrophages and model membranes. **Clin Haematol**. 1985;191:141-61.

Heissig B, Hattori K, Dias S, Friedrich M, Ferris B, Hackett N.R *et al*. Recruitment of stem and progenitor cells from the bone marrow niche requires MMP-9 mediated release of kit-ligand. **Cell**. 2002;109:625-37.

Herrick JB. Peculiar elongated and sickled-shaped red blood corpuscle in a case of severe anemia. **Arch Intern Med**. 1910;6:517-21.

Higuchi R, Fockler C, Dollinger G, Watson R. Kinetic PCR analysis: real time monitoring of DNA amplification reactions. **Biotechnology (NY)**. 1993;11(9):1026-30.

Hillery CA, Du MC, Wang WC, Scott JP. Hydroxyurea therapy decreases the in vitro adhesion of sickle erythrocytes to thrombospondin and laminin. **Br J Haemat.** 2000;109:322-27.

Hines PC, Zen Q, Burney SN, Shea DA, Ataga KI, Orringer EP *et al.* Novel epinephrine and cyclic AMP-mediated activation of BCAM/Lu-dependent sickle (SS) RBC adhesion. **Blood.** 2003; 101 (8): 3281-87.

Hirschi KK, Ingram DA, Yoder MC. Assessing identity, phenotype, and fate of endothelial progenitor cells. **Arterioscler Thromb Vasc Biol.** 2008;28:1584-95.

Hoppe C, Kuypers F, Larkin S, Hagar W, Vichinsky E, Styles L. A pilot study of the short-term use of simvastatin in sickle cell disease: effects on markers of vascular dysfunction. **Br J Haemat.** 2011;153: 655-63.

Hogg N, Leitinger B. Shape and shift changes related to the function of leukocyte integrins LFA-1 and Mac-1. **J Leukoc Biol.** 2001;69(6): 893-8.

Hristov M, Weber C. Endothelial progenitor cells: characterization, pathophysiology, and possible clinical relevance. **J Cell Mol Med.** 2004;4(8):498-508.

Hynes RO. Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. **Cell.** 1992;69:11-25.

Ingram DA, Lien IZ, Mead LE, Estes M, Prater DN, Derr-Yellin E *et al.* In vitro hyperglycemia or a diabetic intrauterine environment reduces neonatal endothelial colony-forming cell numbers and function. **Diabetes.** 2008;57:724-31..

Jiang A, Wei P, Milbauer LC, Shyr Y, Hebbel RP. A practical question based on cross-platform microarray data normalization are BOEC more like large vessel or microvascular

endothelial cells or neither of them? *Journal of Bioinformatics and Computational Biology*. 2007;5(4):875-93.

Kasschau MR, Barabino GA, Bridges KR, Golan DE. Adhesion of sickle neutrophils and erythrocytes to fibronectin. **Blood**. 1986;87:771-80.

Kahaleh MB, Fan S. Effects of cytokines on the production of endothelin by endothelial cells. **Clin Exp Rheumatol**. 1997;15:163-67.

Kato GJ, Martyr S, Blackwelder WC, Nichols JS, Coles WA, Hunter LA *et al*. Levels of soluble endothelium-derived adhesion molecules in patients with sickle cell disease are associated with pulmonary hypertension, organ dysfunction, and mortality. **Br J Haematol**. 2005;130(6):943–53.

Kato GJ, Gladwin MT, Steinberg MH. Deconstructing sickle cell disease: reappraisal of the role of hemolysis in the development of clinical subphenotypes. **Blood Rev**. 2007;21(1): 37-47.

Kaul DK, Tsai HM, Liu XD, Nakata MT, Nagel RL, Collier BS. Monoclonal antibodies to alpha Vbeta3 (7E3 and LM609) inhibit sickle red blood cell-endothelium interactions induced by platelet-activating factor. **Blood**. 2000;95:368-74.

Kaul DK, Fabry ME, Constantini F, Rubin EM, Nagel RL. In vivo demonstration of red cell-endothelial interaction, sickling and altered microvascular response to oxygen in the sickle transgenic mouse. **J Clin Invest**. 1995;96:2845-53.

Kaul DK, Fabry ME. In vivo studies of sickle red blood cells. **Microcirculation**. 2004;11:153-65.

Kaul DK, Fabry ME, Nagel RL. Microvascular sites and characteristics of sickle cell adhesion to vascular endothelium in shear flow conditions: pathophysiological implications. **Proc Natl Acad Sci USA**. 1989;86:3356–60.

Kaul D, Finnegan E, Barabino GA. Sickle red cell – Endothelium interactions. **Microcirculation**. 2009;16(1):97-111.

Kim KS, Rajagopal V, Gonsalves C, Johnson C, Kalra VK. A novel role of hypoxia-inducible factor in cobalt chloride and hypoxia-mediated expression of IL-8 chemokine in human endothelial cells. **J Immunol**. 2006;177:7211-24.

Kimura M, Kurose I, Russell J, Granger DN. Effects of fluvastatin on leukocyte-endothelial cell adhesion in hypercholesterolemic rats. **Arterioscler, Thromb Vasc Biol**. 1997;17:521–26.

King SB. Nitric oxide production from hydroxyurea. **Free Radical Biology & Medicine**. 2004;37(6):737-44.

Körbling M, Reuben JM, Gao H, Lee BN, Harris DM, Cogdell D, Giralt SA *et al*. Recombinant human granulocyte-colony-stimulating factor-mobilized and apheresis-collected endothelial progenitor cells: a novel blood cells component for therapeutic vasculogenesis. **Transfusion**. 2006;46:1795-802.

Kumar A, Eckman JR, Swerlick RA, Wick TM. Phorbol ester stimulation increases sickle erythrocyte adherence to endothelium: A novel pathway involving alpha 4 beta 1 integrin receptors on sickle reticulocytes and fibronectin. **Blood**. 1996;88:4348-58.

Kureishi, YZ . The HMG-C6A reductase inhibitor simvastatin activates the protein kinase Akt and promotes angiogenesis in hypercholesterolemic animals. **Nat Med**. 2000;9: 1004-10.

Lanaro C, Franco-Penteado CF, Albuquerque DM, Saad STO, Conran N, Costa FF. Altered levels of cytokines and inflammatory mediators in plasma and leukocytes of sickle cell anemia patients and effects of hydroxyurea therapy. **J Leukoc Biol.** 2009; 85:235-42.

Lassmann G, Thelander L, Graslund A. EPR stopped-flow studies of reaction of the tyrosyl radical of protein R2 from ribonucleotide reductase with hydroxyurea. **Biochem Biophys Res Commun.** 1992;188(2): 879-87.

Lee G, Lo A, Short SA, Mankelow TJ, Spring F, Parsons SF, et al. Targeted gene deletion demonstrates that the cell adhesion molecule ICAM-4 is critical for erythroblastic island formation. **Blood.** 2006;108:2064–71

Liao JK, Laufs U. Pleiotropic effects of statins. **Annu Rev Pharmacol Toxicol.** 2005; 45:89-118.

Lin Y, Weisdorf DJ, Solovey A, Hebbel RP. Origins of circulating endothelial cells and endothelial outgrowth from blood. **J. Clin. Invest.** 2000;105:71-7.

Lin Y, Chang L, Solovey A, Healey JF, Lollar P, Hebbel RP. Use of blood outgrowth endothelial cells for gene therapy for hemophilia A. **Blood.** 2002;99:457-62.

Mack AK; Kato GJ. Sickle cell disease and nitric oxide: A paradigm shift? **Int J Biochem Cell Biol.** 2006;38(8):1237-43.

Makis AC, Hatzimichael, EC, Bourantas KL. The role of cytokines in sickle cell disease. **Ann. Hematol.** 2000;79:407–13.

Martin-Ramirez J, Hofman M, van den Biggelaar M, Hebbel RP, Voorberg J. Establishment of outgrowth endothelial cells from peripheral blood. **Nat protocol.** 2012;7(9):1709-15.

Matsui NM, Borsig L, Rosen SD, Yaghmai M, Varki A, Embury SH. P-selectin mediates the adhesion of sickle erythrocytes to the endothelium. **Blood**. 2001; 98: 1955-62.

Matsui H, Shibata M, Brown B, Labelle A, Hegadorn C, Andrews C *et al*. Ex vivo gene therapy for hemophilia A that enhances safe delivery and sustained in vivo factor VIII expression from lentivirally engineered endothelial progenitors. **Stem Cells**. 2007; 25, 2660-69.

Matsui NM, Borsig L, Rosen SD, Yaghmai M, Varki A, Embury SH. P-selectin mediates the adhesion of sickle erythrocytes to the endothelium. **Blood**. 2001;98:955–62.

Medina RJ, O'Neill CL, Sweeney M, Guduric-Fuchs J, Gardiner TA, Simpson DA *et al*. Molecular analysis of endothelial progenitor cell (EPC) subtypes reveals two distinct cell populations with different identities. **Bio Med Central**. 2010;3(18)1-13.

Meijerink J, Mandigers C, Loch L V, Tönnissen E, Goodsaid F, Raemaekers J. A novel method to compensate for different amplification efficiencies between patient DNA samples in quantitative real-time PCR. **J Mol Diag**. 2001;3(2):55-61.

Milbauer LC, Wei P, Enenstein J, Jiang A, Hillery CA, Scott JP *et al*. Genetic endothelial systems biology of sickle stroke risk. **Blood**. 2008;111(1):3872-79.

Milbauer LC; Enenstein JA; Roney M; Solovey A; Bodempudi V; Nichols TC *et al*. Blood outgrowth endothelial cell migration and trapping in vivo: a window into gene therapy. **Translational Research**. 2009;153(4):180-9.

Miller-Kasprzak E, Jagodzinski PP. Endothelial progenitor cells as a new agent contributing to vascular repair. **Arch Immunol Ther Exp**. 2007;55:247-59.

Natarajan M; Udden MM, McIntire LV. Adhesion of sickle red blood cells and damage to interleukin-1 beta stimulated endothelial cells under flow in vitro. **Blood**. 1996; 87:4845-52.

Niwa S, Totsuka T, Hayashi S. Inhibitory effect of fluvastatin, an HMG-CoA reductase inhibitor, on the expression of adhesion molecules on human monocyte cell line. **Int J Immunopharmacol**. 1996;18:669–75.

Okpala, I. Leukocyte adhesion and the pathophysiology of sickle cell disease. **Current Opinion in Hematology**. 2006;13:40-4.

Pathare A, Al Kindi S, Alnaqdy AA, Daar S, Knox-Macaulay H, Dennison D. Cytokine profile of sickle cell disease in Oman. **Am. J. Hematol**. 2004;77:323–28.

Pobber, JS; Min W; Bradley JR. Mechanisms of Endothelial Dysfunction, Injury, and Death. **Annu Rev Pathol. Mech. Dis**. 2009;4:72-95.

Reiter CD, Wang X, Tanus-Santos JE, Hogg N, Cannon RO, Schechter AN, Gladwin MT. Cell-free hemoglobin limits nitric oxide bioavailability in sickle-cell disease. **Nature Medicine**. 2002;8(12):1383:89.

Rignault-Clerc S, Biemann C, Delodder F, Raffoul W, Waeber B, Liaudet L et al. Functional late outgrowth endothelial progenitors isolated from peripheral blood of burned patients. *Burns*. doi:pii:S0305-4179(12)00320-8. 10.1016/j.burns.2012.09.027.

Rother RP, Bell L, Hillmen P, Gladwin MT. The clinical sequelae of intravascular hemolysis and extracellular plasma hemoglobin. A novel mechanism of human disease. **JAMA**. 2005; 293(13):1653-62.

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. **J Cell Mol Med.** 2009;3(13):454-71.

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):e13-21.

Setty BN, Betal SG, Zhang J, Stuart MJ. Heme induces endothelial tissue factor expression: potencial role in hemostatic activation in patient with hemolytic anemia. **J Thromb Haemost.** 2008;6:2202-9.

Shimaoka M, Takagi J, Springer TA. Conformational regulation of integrin structure and function. **Annu Rev Biophys Biomol Struct.** 2002;31:485-516.

Sims TN, Dustin ML. The immunological synapse: integrins take the stage. **Immunol Rev.** 2002;186:100-17.

Solovey A, Lin Y, Browne P, Choong S, Wayner E, Hebbel RP. Circulating activated endothelial cells is sickle cell anemia. **N Engl J Med.** 1997;337:1584-90.

Solovey A, Gui L, Key NS, Hebbel RP. Tissue Factor Expression by Endothelial Cells in Sickle Cell Anemia. **J Clin Invest.** 1998;101(9):1899-904.

Solovey A, Kollander R, Shet A, Milbauer LC, Choong S, Panoskaltsis-Mortari A *et al.* Endothelial cell expression of tissue factor in sickle mice is augmented by hypoxia/reoxygenation and inhibited by lovastatin. **Blood.** 2004;104(3):840-6.

Space SL, Lane PA, Pickett CK, Weil JV. Nitric oxide attenuates normal and sickle red blood cell adherence to pulmonary endothelium. **Am J Hematology.** 2000;63:200-04.

Steinberg MH. Management of sickle cell disease. **N Engl J Med**, 1999;340:1021-30.

Steinberg MH. Pathophysiologically based drug treatment of sickle cell disease. **TRENDS in Pharmacological Sciences**. 2006;27(4):204-10.

Steinberg MH, Barton F, Castro, Pegelow CH, Ballas SK, Kutlar A et al. Effect of hydroxyurea on mortality and morbidity in adult sickle cell anemia: Risks and benefits up to 9 years of treatment. **JAMA**, 2003;289:1645-51.

Strijbos MH. Circulating endothelial cells: a potential parameter of organ damage in sickle cell anemia? **Blood Cells, Molecules and Disease**. 2009;43:63-67.

Stronceck JD, Grant BS, Brown MA, Povsic TJ, Truskey GA, Reichert WA. Comparison of endothelial cell phenotypic Markers of late-outgrowth endothelial progenitor cells isolated from patients with coronary artery disease and healthy volunteers. **Tissue Engineering**. 2009;15(11):3473-86.

Stuart MJ, Nagel RL. Sickle-cell disease. **Lancet**. 2004;364:1343-60.

Sugihara K, Sugihara T, Mohandas N, Hebbel RP. Thrombospondin mediates adherence of CD36<sup>+</sup> sickle reticulocytes to endothelial cells. **Blood**. 1992;80:2634-42.

Swerlick RA, Eckman JR, Kumar A, Jeitler M, Wick TM. Alpha 4 beta 1-integrin expression on sickle reticulocytes: vascular cell adhesion molecule-1-dependent binding to endothelium. **Blood**. 1993 82:1891-99.

Urbich C, Dimmeler S. Endothelial progenitor cells: characterization and role in vascular biology. **Circ Res**. 2004;95:243-53.

Van Beem RT, Verloop RE, Kleijer M, Noort WA, Loof N, Koolwijk, Ellen Van Der Schoot C *et al.* Blood outgrowth endothelial cells from cord blood and peripheral blood: angiogenesis-related characteristics in vitro. **J Thrombo Haemos.** 2008;7:217-26.

Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe, B, Van Roy N, De Paepe A *et al.* Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. **Genome Biol.** 2002; 3(7):1-12.

Vaughan CJ, Gotto Jr M, Bsson CT. The evolving role of statins in the management of atherosclerosis. **Journal of the American College of Cardiology.** 2000; 35: 1-8.

Vordermeier S, Singh S, Biggerstaff J, Harrison P, Grech H, Pearson TC *et al.* Red blood cells from patients with sickle cell disease exhibit an increased adherence to cultured endothelium pretreated with tumour necrosis factor (TNF). **Br J Haematol.** 1992; 81 (4): 591–97.

Walmet PS; Eckman JR, Wick TM. Inflammatory mediators promote Strong sickle cell adherence to endothelium under venular flow conditions. **Am J Hematology.** 2003;73:215-24.

Wei P, Milbauer LC, Enenstein J, Nguyen J, Pan W, Hebbel RP. Differential endothelial cell gene expression by African Americans versus Caucasian Americans: a possible contribution to health disparity in vascular disease and cancer. **BMC Med.** 2011; 9:2-18.

Wick TM, Moake JL, Udden MM, Eskin SG, Sears DA, McIntire LV. Unusually large von Willebrand factor multimers increase adhesion of sickle erythrocytes to human endothelial cells under controlled flow. **J Clin Invest.** 1987;80:905–10.

Yarbro, J.W. Mechanism of action of hydroxyurea. **Seminars on Oncology.** 1992;19:1-10.

Yasin Z, Witting S, Palascak MB, Joiner CH, Rucknagel AL, Franco RS. Phosphatidylserine externalization in sickle red blood cells: associations with cell, age, density and hemoglobin F. **Blood**. 2003;102(1):365-70.



***ANEXO***



## 8.1 Anexo 1 - Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa da FCM/UNICAMP



FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS  
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

[www.fcm.unicamp.br/pesquisa/etica/index.html](http://www.fcm.unicamp.br/pesquisa/etica/index.html)

CEP, 26/10/10  
(Grupo III)

PARECER CEP: Nº 968/2010 (Este nº deve ser citado nas correspondências referente a este projeto).  
CAAE: 0753.0.146.000-10

### I - IDENTIFICAÇÃO:

PROJETO: “AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES ADESIVAS E INFLAMATÓRIAS DAS CÉLULAS ENDOTELIAIS – BLOOD OUTGROWTH ENDOTHELIAL CELLS – DE PACIENTES COM ANEMIA FALCIFORME”.

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Tatiana Mary Sakamoto

INSTITUIÇÃO: Hemocentro/UNICAMP

APRESENTAÇÃO AO CEP: 06/10/2010

APRESENTAR RELATÓRIO EM: 26/10/11 (O formulário encontra-se no *site* acima).

### II - OBJETIVOS

Avaliar as propriedades adesivas e inflamatórias das células endoteliais nos pacientes com anemia falciforme, comparando essas propriedades com as de pacientes com outro tipo de anemia hemolítica (esferocitose hereditária) e indivíduos saudáveis.

### III - SUMÁRIO

A pesquisa constituirá na análise das propriedades de células endoteliais de 15 indivíduos distribuídos em três grupos. Dois grupos terão como participantes pacientes do Hemocentro/UNICAMP, com anemia falciforme e outro com anemia hemolítica. O recrutamento será feito a partir do atendimento. O terceiro grupo será constituído por indivíduos saudáveis, recrutados a partir da divulgação oral da pesquisa junto à comunidade científica. O grupo constituído por indivíduos saudáveis e o grupo de indivíduos com anemia hemolítica serão grupos controle, respectivamente grupo 1 e 2. Serão coletadas duas amostras de sangue de 54 ml, para cultura de células e 13 ml, para experimentos de adesão celular. Os critérios de inclusão para o grupo controle com pessoas saudáveis é ter idade variando entre 18 e 50 anos. Entre os pacientes é necessário o diagnóstico de esferocitose hereditária (controle 2) e anemia falciforme, além de condições estáveis da doença. Serão excluídos pacientes com doenças hepáticas, renais, psiquiátricas e neurológicas, além da recusa a seguir o protocolo da pesquisa.

### IV - COMENTÁRIOS DOS RELATORES

Após análise crítica do protocolo não encontramos riscos ou prejuízos para os sujeitos da pesquisa (possibilidade e gravidade). Os autores do projeto se mostram com o compromisso de cumprir as exigências da Resolução 196/96 e suas complementares. O trabalho está elaborado dentro das normas éticas e científicas. O Termo de Consentimento Livre e Esclarecido é adequado.

Comitê de Ética em Pesquisa - UNICAMP  
Rua: Tessália Vieira de Camargo, 126  
Caixa Postal 6111  
13083-887 Campinas – SP

FONE (019) 3521-8936  
FAX (019) 3521-7187  
[cep@fcm.unicamp.br](mailto:cep@fcm.unicamp.br)

- 1 -



#### V - PARECER DO CEP

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, após acatar os pareceres dos membros-relatores previamente designados para o presente caso e atendendo todos os dispositivos das Resoluções 196/96 e complementares, resolve aprovar sem restrições o Protocolo de Pesquisa, o Termo do Consentimento Livre e Esclarecido, bem como todos os anexos incluídos na pesquisa supracitada.

O conteúdo e as conclusões aqui apresentados são de responsabilidade exclusiva do CEP/FCM/UNICAMP e não representam a opinião da Universidade Estadual de Campinas nem a comprometem.

#### VI - INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES

O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (Res. CNS 196/96 – Item IV.1.f) e deve receber uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado (Item IV.2.d).

Pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou (Res. CNS Item III.1.z), exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade do regime oferecido a um dos grupos de pesquisa (Item V.3.).

O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Res. CNS Item V.4.). É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.

Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Em caso de projeto do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma junto com o parecer aprovatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial (Res. 251/97, Item III.2.e).

Relatórios parciais e final devem ser apresentados ao CEP, de acordo com os prazos estabelecidos na Resolução CNS-MS 196/96.

#### VII – DATA DA REUNIÃO

Homologado na X Reunião Ordinária do CEP/FCM, em 26 de outubro de 2010.

**Prof. Dr. Carlos Eduardo Steiner**  
PRESIDENTE do COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA  
FCM/UNICAMP

# *APÊNDICE*



## 9. APÊNDICE

### 9.1 Apêndice 1

Tabela de análise do perfil de expressão gênica por PCR-Array nas BOECs de pacientes AF em estado basal, em comparação à BOEC Con

| Genes          | BOEC SS (N=3)      |          | BOEC SSHU (N=3)    |          | BOEC SSTrf (N=3)   |          |
|----------------|--------------------|----------|--------------------|----------|--------------------|----------|
|                | <i>Fold Change</i> | P        | <i>Fold Change</i> | P        | <i>Fold Change</i> | P        |
| <i>ACE</i>     | 0,3                | 0,18105  | 0,2088             | 0,825334 | 0,739              | 0,562241 |
| <i>ADAM17</i>  | 1,2237             | 0,233939 | 1,1519             | 0,371143 | 1,0582             | 0,667345 |
| <i>AGT</i>     | #                  | #        | #                  | #        | #                  | #        |
| <i>AGTR1</i>   | #                  | #        | #                  | #        | #                  | #        |
| <i>ALOX5</i>   | #                  | #        | #                  | #        | #                  | #        |
| <i>ANGPT1</i>  | 0,4085             | 0,491435 | 0,9877             | 0,934664 | 7,3695             | 0,31195  |
| <i>ANXA5</i>   | #                  | #        | #                  | #        | #                  | #        |
| <i>APOE</i>    | 1,0983             | 0,829543 | 1,2614             | 0,824412 | #                  | #        |
| <i>BAX</i>     | 6,5686             | 0,910661 | #                  | #        | 195,2039           | 0,115941 |
| <i>BCL2</i>    | 1,4767             | 0,449948 | 1,2661             | 0,892532 | 0,109              | 0,107878 |
| <i>BCL2L1</i>  | 2,547              | 0,21156  | 1,5486             | 0,154954 | 1,357              | 0,329118 |
| <i>CALCA</i>   | #                  | #        | #                  | #        | #                  | #        |
| <i>CASP1</i>   | 1,1352             | 0,941148 | 0,7829             | 0,676437 | 0,5761             | 0,267936 |
| <i>CASP3</i>   | 1,7174             | 0,067405 | 1,1428             | 0,452952 | 1,1643             | 0,37874  |
| <i>CAV1</i>    | 1,0312             | 0,877009 | 0,7893             | 0,993384 | 14,7045            | 0,103863 |
| <i>CCL2</i>    | 1,1526             | 0,680038 | 0,6844             | 0,526713 | 0,1908             | 0,038524 |
| <i>CCL5</i>    | 1,0857             | 0,736282 | 2,5085             | 0,589155 | 1,9573             | 0,872071 |
| <i>CDH5</i>    | 1,4732             | 0,393697 | 0,7765             | 0,406667 | 0,5462             | 0,175687 |
| <i>CFLAR</i>   | 1,0085             | 0,991734 | 0,7919             | 0,24601  | 0,6468             | 0,096971 |
| <i>COL18A1</i> | 0,9398             | 0,634335 | 0,6019             | 0,328759 | 0,4024             | 0,144131 |
| <i>CX3CL1</i>  | #                  | #        | #                  | #        | #                  | #        |
| <i>EDN1</i>    | 1,2246             | 0,843561 | 0,938              | 0,757146 | 20,4787            | 0,292965 |
| <i>EDN2</i>    | 0,6991             | 0,624442 | 1,5453             | 0,488722 | #                  | #        |
| <i>EDNRA</i>   | 0,0982             | 0,322895 | 1,167              | 0,860218 | 0,133              | 0,41281  |
| <i>ENG</i>     | 1,0284             | 0,97366  | 1,403              | 0,884355 | 101,5583           | 0,287785 |
| <i>F2R</i>     | 1,1605             | 0,790308 | 1,2686             | 0,599254 | 0,4189             | 0,108511 |
| <i>F3</i>      | #                  | #        | #                  | #        | #                  | #        |
| <i>FAS</i>     | 52,9385            | 0,658824 | 8,3044             | 0,581759 | 329,2933           | 0,00654  |
| <i>FASLG</i>   | 2,5905             | 0,922249 | 1,0685             | 0,952852 | 0,0056             | 0,134482 |
| <i>FGF1</i>    | #                  | #        | #                  | #        | #                  | #        |
| <i>FGF2</i>    | 1,6532             | 0,636286 | 3,1504             | 0,67523  | 62,918             | 0,434906 |
| <i>FLT1</i>    | 1,3219             | 0,821123 | 1,4745             | 0,513313 | 3,2557             | 0,168186 |
| <i>FNI</i>     | 0,7377             | 0,296828 | 1,0908             | 0,812864 | 0,7639             | 0,360263 |
| <i>HIF1A</i>   | 0,999              | 0,960434 | 0,9896             | 0,822079 | 0,8585             | 0,562273 |

|                 |        |          |        |          |         |          |
|-----------------|--------|----------|--------|----------|---------|----------|
| <i>HMOX1</i>    | #      | #        | #      | #        | #       | #        |
| <i>ICAM1</i>    | #      | #        | #      | #        | #       | #        |
| <i>IL11</i>     | #      | #        | #      | #        | 1,4375  | 0,574696 |
| <i>IL1B</i>     | 6,5311 | 0,190744 | #      | #        | 1,1153  | 0,560316 |
| <i>IL3</i>      | 0,8996 | 0,830474 | 0,8527 | 0,984185 | #       | #        |
| <i>IL6</i>      | 1,5088 | 0,998663 | 7,3428 | 0,979608 | 51,4777 | 0,178018 |
| <i>IL7</i>      | 1,6748 | 0,550688 | 3,0519 | 0,408752 | 0,0096  | 0,116871 |
| <i>ITGA5</i>    | 1,6233 | 0,470538 | 1,6128 | 0,394411 | 2,0496  | 0,376035 |
| <i>ITGAV</i>    | 1,5045 | 0,444112 | 1,1677 | 0,682938 | 0,2586  | 0,100863 |
| <i>ITGB1</i>    | 1,2113 | 0,767909 | 1,3864 | 0,772716 | 11,9942 | 0,214776 |
| <i>ITGB3</i>    | 1,2859 | 0,516347 | 0,5881 | 0,198633 | 0,5398  | 0,165    |
| <i>KDR</i>      | 4,622  | 0,5093   | #      | #        | 38,1487 | 0,065597 |
| <i>KIT</i>      | #      | #        | #      | #        | #       | #        |
| <i>KLK3</i>     | 0,388  | 0,759119 | 0,6977 | 0,469545 | #       | #        |
| <i>MMP1</i>     | #      | #        | #      | #        | 1,2335  | 0,369014 |
| <i>MMP2</i>     | #      | #        | #      | #        | #       | #        |
| <i>MMP9</i>     | #      | #        | #      | #        | #       | #        |
| <i>NOS3</i>     | 1,0136 | 0,638007 | 0,4104 | 0,755474 | 0,2924  | 0,17664  |
| <i>NPPB</i>     | #      | #        | #      | #        | #       | #        |
| <i>NPR1</i>     | #      | #        | #      | #        | 11,5578 | 0,070751 |
| <i>OCLN</i>     | 0,6982 | 0,808333 | 0,3376 | 0,105264 | 0,38    | 0,102362 |
| <i>PDGFRA</i>   | #      | #        | #      | #        | #       | #        |
| <i>PECAM1</i>   | 1,0908 | 0,457028 | 0,2916 | 0,045437 | 1,2057  | 0,300666 |
| <i>PF4</i>      | #      | #        | #      | #        | #       | #        |
| <i>PGF</i>      | 3,9386 | 0,42873  | 0,9818 | 0,675748 | 8,9349  | 0,110889 |
| <i>PLAT</i>     | 1,7199 | 0,908626 | 2,5732 | 0,730681 | 0,3145  | 0,22124  |
| <i>PLAU</i>     | 0,9816 | 0,468693 | 0,9271 | 0,535768 | 13,6544 | 0,31502  |
| <i>PLG</i>      | 3,1296 | 0,249211 | 2,1761 | 0,452902 | 0,0382  | 0,117391 |
| <i>PROCR</i>    | 0,9988 | 0,923627 | #      | #        | 755,929 | 0,090833 |
| <i>PTGIS</i>    | 0,2733 | 0,040915 | 0,1605 | 0,085212 | 0,4541  | 0,070149 |
| <i>PTGS2</i>    | 0,3424 | 0,724303 | 0,9722 | 0,759146 | 0,1462  | 0,166495 |
| <i>PTK2</i>     | 1,5373 | 0,669717 | 1,141  | 0,875701 | 3,6783  | 0,138515 |
| <i>SELE</i>     | 0,0528 | 0,004131 | 0,1919 | 0,008356 | 0,489   | 0,046348 |
| <i>SELL</i>     | 1,1025 | 0,941507 | 0,2163 | 0,450844 | 2,6172  | 0,113331 |
| <i>SELPLG</i>   | 2,6013 | 0,381368 | 4,6719 | 0,176035 | 3,3429  | 0,223163 |
| <i>SERPINE1</i> | 1,8382 | 0,457344 | 1,4361 | 0,544816 | 1,6338  | 0,550725 |
| <i>SOD1</i>     | 1,4715 | 0,048406 | 1,536  | 0,067491 | 1,1326  | 0,583925 |
| <i>SPHK1</i>    | 0,7401 | 0,635244 | 1,2201 | 0,558972 | 1,1719  | 0,659358 |
| <i>TEK</i>      | 1,1264 | 0,588031 | 1,0544 | 0,764346 | 0,9123  | 0,887678 |
| <i>TFPI</i>     | 0,739  | 0,852344 | 0,7662 | 0,738198 | 0,815   | 0,137424 |
| <i>TGFB1</i>    | 0,691  | 0,85194  | 1,0226 | 0,955661 | 9,2751  | 0,163759 |

|                |        |          |        |          |         |          |
|----------------|--------|----------|--------|----------|---------|----------|
| <i>THBD</i>    | 1,4661 | 0,812153 | 0,9744 | 0,961913 | 0,0081  | 0,153605 |
| <i>THBS1</i>   | 0,8333 | 0,809286 | 0,8307 | 0,732607 | 5,0529  | 0,384003 |
| <i>TIMP1</i>   | 1,524  | 0,581146 | 3,8548 | 0,681798 | 86,9922 | 0,033109 |
| <i>TNF</i>     | 0,7757 | 0,329642 | 3,9845 | 0,637936 | 0,0096  | 0,118881 |
| <i>TNFSF10</i> | 1,394  | 0,458029 | 0,9705 | 0,79138  | 1,7893  | 0,216845 |
| <i>TYMP</i>    | 0,7832 | 0,283421 | 0,5441 | 0,698774 | 0,0747  | 0,140064 |
| <i>VCAM1</i>   | 0,0895 | 0,130159 | 0,8555 | 0,666462 | 0,4176  | 0,147728 |
| <i>VEGFA</i>   | 0,8716 | 0,476127 | 1,4786 | 0,329522 | 1,0556  | 0,870778 |
| <i>VWF</i>     | 0,6419 | 0,890696 | 0,0976 | 0,016053 | 0,4518  | 0,13067  |

#Expressão gênica não detectada. A PCR *array* para 84 genes foi realizada para BOECs de indivíduos-controle, pacientes AF sem HU (SS), pacientes AF com HU (SSHU) e pacientes em transfusão regular (SSTrf). *Fold change* em vermelho foram genes superexpressos e, em azul foram subexpressos quando comparadas às expressões gênicas de BOECs Con. Os valores de P em vermelho ( $P < 0,05$ ) foram significativos quando comparado ao grupo de controle. Teste t de Student.

## 9.2 Apêndice 2

Tabela de análise do perfil de expressão gênica por PCR-Array em BOECs de pacientes AF tratadas com TNF- $\alpha$ , em comparação à BOEC Con

| Gene           | BOEC SS (N=3)      |          | BOEC SSHU (N=3)    |          | BOEC SSTrf (N=3)   |          |
|----------------|--------------------|----------|--------------------|----------|--------------------|----------|
|                | <i>Fold change</i> | P        | <i>Fold Change</i> | P        | <i>Fold change</i> | P        |
| <i>ACE</i>     | -4,3437            | 0,189066 | -8,3677            | 0,504034 | 0,5544             | 0,399518 |
| <i>ADAM17</i>  | 1,1027             | 0,551952 | 1,0459             | 0,689925 | -1,0878            | 0,679443 |
| <i>AGT</i>     | #                  | #        | #                  | #        | #                  | #        |
| <i>AGTR1</i>   | #                  | #        | #                  | #        | #                  | #        |
| <i>ALOX5</i>   | #                  | #        | #                  | #        | #                  | #        |
| <i>ANGPT1</i>  | #                  | #        | #                  | #        | #                  | #        |
| <i>ANXA5</i>   | #                  | #        | #                  | #        | #                  | #        |
| <i>APOE</i>    | 1,1871             | 0,862687 | -1,0093            | 0,932192 | #                  | #        |
| <i>BAX</i>     | 4,4168             | 0,765961 | #                  | #        | 187,7325           | 0,118564 |
| <i>BCL2</i>    | 1,3486             | 0,900924 | 1,0454             | 0,959501 | #                  | #        |
| <i>BCL2L1</i>  | 2,0493             | 0,082943 | 1,5664             | 0,068837 | 1,3384             | 0,454976 |
| <i>CALCA</i>   | #                  | #        | #                  | #        | #                  | #        |
| <i>CASP1</i>   | 1,453              | 0,539143 | -1,0119            | 0,988108 | -1,6737            | 0,275914 |
| <i>CASP3</i>   | -1,0683            | 0,563933 | -1,2425            | 0,206216 | -1,0797            | 0,494097 |
| <i>CAVI</i>    | 1,2207             | 0,928783 | -1,0769            | 0,979755 | 29,0627            | 0,109036 |
| <i>CCL2</i>    | -1,2054            | 0,939939 | -1,1914            | 0,730616 | -3,0866            | 0,090836 |
| <i>CCL5</i>    | 3,4401             | 0,469187 | 3,0577             | 0,522807 | 2,2353             | 0,702474 |
| <i>CDH5</i>    | 1,4494             | 0,377153 | 1,0123             | 0,906625 | -1,8216            | 0,16032  |
| <i>CFLAR</i>   | 1,0882             | 0,63507  | -1,1146            | 0,592046 | -1,3654            | 0,085669 |
| <i>COL18A1</i> | -1,0879            | 0,554453 | -1,6185            | 0,260286 | -2,6042            | 0,135129 |
| <i>CX3CL1</i>  | #                  | #        | #                  | #        | #                  | #        |
| <i>EDN1</i>    | 1,5507             | 0,894447 | 1,1102             | 0,628007 | 28,7678            | 0,310787 |
| <i>EDN2</i>    | 1,1996             | 0,844166 | -1,2395            | 0,912183 | #                  | #        |
| <i>EDNRA</i>   | -1,2825            | 0,719466 | 1,9981             | 0,297515 | #                  | #        |
| <i>ENG</i>     | 1,1333             | 0,990681 | 1,0556             | 0,954211 | 58,0486            | 0,26536  |
| <i>F2R</i>     | -1,0233            | 0,88189  | 1,0237             | 0,757897 | -3,0608            | 0,134529 |
| <i>F3</i>      | 10,1532            | 0,819445 | #                  | #        | 57,3501            | 0,159748 |
| <i>FAS</i>     | 6,9038             | 0,655849 | 6,1403             | 0,519197 | 410,1987           | 0,006419 |
| <i>FASLG</i>   | 4,5258             | 0,387124 | 1,2913             | 0,667582 | #                  | #        |
| <i>FGF1</i>    | 7,6596             | 0,374542 | -1,3145            | 0,669175 | 5,2022             | 0,153728 |
| <i>FGF2</i>    | #                  | #        | #                  | #        | #                  | #        |
| <i>FLT1</i>    | 3,7864             | 0,381262 | 1,3703             | 0,48514  | 3,0398             | 0,122162 |
| <i>FN1</i>     | -2,2597            | 0,16552  | 1,0668             | 0,773578 | -1,2685            | 0,417165 |
| <i>HIF1A</i>   | 1,0106             | 0,983568 | 1,1017             | 0,928626 | -7,4849            | 0,120316 |
| <i>HMOX1</i>   | #                  | #        | #                  | #        | #                  | #        |

|                 |         |          |         |          |           |          |
|-----------------|---------|----------|---------|----------|-----------|----------|
| <i>ICAM1</i>    | #       | #        | #       | #        | #         | #        |
| <i>IL11</i>     | 20,1067 | 0,020957 | 1,0059  | 0,772867 | -6,1937   | 0,267944 |
| <i>IL1B</i>     | #       | #        | #       | #        | #         | #        |
| <i>IL3</i>      | 1,5773  | 0,557849 | 1,7016  | 0,45349  | #         | #        |
| <i>IL6</i>      | 3,6367  | 0,425875 | 2,9423  | 0,464163 | 11,4454   | 0,004547 |
| <i>IL7</i>      | 2,073   | 0,426931 | 2,4369  | 0,42221  | -6,8645   | 0,14278  |
| <i>ITGA5</i>    | 1,2946  | 0,433389 | 1,4285  | 0,346017 | 1,6005    | 0,388771 |
| <i>ITGAV</i>    | 1,4548  | 0,339463 | 1,2495  | 0,499806 | -2,0985   | 0,124127 |
| <i>ITGB1</i>    | 1,3894  | 0,757032 | 1,3031  | 0,679973 | 12,0524   | 0,139116 |
| <i>ITGB3</i>    | 1,7196  | 0,208634 | -1,4581 | 0,907013 | 1,8459    | 0,104796 |
| <i>KDR</i>      | 2,7991  | 0,524386 | #       | #        | 46,3695   | 0,055309 |
| <i>KIT</i>      | #       | #        | #       | #        | #         | #        |
| <i>KLK3</i>     | -1,7538 | 0,730661 | -1,3641 | 0,688481 | #         | #        |
| <i>MMP1</i>     | 1,1849  | 0,452916 | -5,2766 | 0,330572 | 1,434     | 0,312354 |
| <i>MMP2</i>     | #       | #        | -#      | #        | #         | #        |
| <i>MMP9</i>     | #       | #        | #       | #        | #         | #        |
| <i>NOS3</i>     | 1,7286  | 0,524475 | -1,2643 | 0,565555 | -1,8382   | 0,219805 |
| <i>NPPB</i>     | #       | #        | #       | #        | #         | #        |
| <i>NPR1</i>     | #       | #        | #       | #        | #         | #        |
| <i>OCN</i>      | -1,1387 | 0,85057  | -1,7445 | 0,246191 | -1,6463   | 0,239783 |
| <i>PDGFRA</i>   | #       | #        | #       | #        | #         | #        |
| <i>PECAM1</i>   | 1,3432  | 0,359354 | -3,1363 | 0,044036 | 1,3052    | 0,182281 |
| <i>PF4</i>      | #       | #        | #       | #        | #         | #        |
| <i>PGF</i>      | 5,3941  | 0,427862 | 1,5454  | 0,51501  | 12,6996   | 0,105133 |
| <i>PLAT</i>     | -1,1698 | 0,986317 | 1,3192  | 0,661946 | -3,5934   | 0,147148 |
| <i>PLAU</i>     | 2,1949  | 0,484844 | 1,8075  | 0,494081 | 88,4462   | 0,225595 |
| <i>PLG</i>      | 2,6982  | 0,215979 | -1,5032 | 0,394882 | -53,2667  | 0,116955 |
| <i>PROCR</i>    | #       | #        | #       | #        | #         | #        |
| <i>PTGIS</i>    | -2,5244 | 0,018028 | -4,9738 | 0,132572 | -2,0058   | 0,034193 |
| <i>PTGS2</i>    | 1,4437  | 0,694507 | 1,551   | 0,67657  | -2,9627   | 0,159247 |
| <i>PTK2</i>     | 1,4425  | 0,599867 | 1,1105  | 0,695353 | 2,8073    | 0,090346 |
| <i>SELE</i>     | 1,0572  | 0,704914 | -1,6467 | 0,111653 | -1,0597   | 0,508539 |
| <i>SELL</i>     | 2,3845  | 0,333801 | -3,0256 | 0,910443 | 2,9005    | 0,12677  |
| <i>SELPLG</i>   | 2,1012  | 0,401498 | 4,4691  | 0,119479 | 3,3094    | 0,250392 |
| <i>SERPINE1</i> | 1,0655  | 0,870131 | 1,0271  | 0,856018 | 1,1662    | 0,660029 |
| <i>SOD1</i>     | 1,5924  | 0,012994 | 1,6264  | 0,049857 | 1,1405    | 0,41292  |
| <i>SPHK1</i>    | 1,2432  | 0,474709 | 1,2055  | 0,484432 | 1,1449    | 0,624648 |
| <i>TEK</i>      | 1,2698  | 0,080369 | 1,2947  | 0,366955 | 1,0346    | 0,745946 |
| <i>TFPI</i>     | 1,012   | 0,710274 | 1,2135  | 0,474347 | 1,015     | 0,863459 |
| <i>TGFB1</i>    | 1,3545  | 0,946477 | 1,2993  | 0,974024 | 29,8321   | 0,173362 |
| <i>THBD</i>     | -1,1178 | 0,95168  | 1,0399  | 0,893669 | -385,2194 | 0,190405 |

|                |         |          |          |          |          |          |
|----------------|---------|----------|----------|----------|----------|----------|
| <i>THBS1</i>   | -1,302  | 0,684723 | -1,1304  | 0,74438  | 5,2375   | 0,367444 |
| <i>TIMP1</i>   | 1,9086  | 0,470123 | -2,3309  | 0,360809 | 4,853    | 0,019857 |
| <i>TNF</i>     | 2,1151  | 0,601541 | 1,6451   | 0,566857 | -16,8493 | 0,150155 |
| <i>TNFSF10</i> | 2,1033  | 0,18592  | 1,2357   | 0,351061 | 3,7457   | 0,058574 |
| <i>TYMP</i>    | 1,3232  | 0,67957  | -1,5945  | 0,862895 | -10,983  | 0,125349 |
| <i>VCAMI</i>   | -1,093  | 0,981059 | -1,2835  | 0,743289 | -1,1089  | 0,685342 |
| <i>VEGFA</i>   | 1,281   | 0,595157 | -1,0227  | 0,953296 | 1,5855   | 0,245589 |
| <i>VWF</i>     | -1,5959 | 0,837272 | -12,9777 | 0,080006 | -2,3911  | 0,237539 |

# Expressão gênica não detectada. A PCR *array* para 84 genes foi realizada para BOECs de indivíduos-controle, pacientes AF sem HU (SS), pacientes AF com HU (SSHU) e pacientes em transfusão regular (SSTrf) após estímulo com TNF- $\alpha$  (10ng/mL, 3h, 37<sup>0</sup>C, 5%CO<sub>2</sub>). *Fold change* em vermelho foram genes superexpressos e, em azul foram subexpressos quando comparadas às expressões gênicas de BOECs Con. Os valores de P em vermelho (P<0,05) foram significativos quando comparado ao grupo controle. Teste t de Student.

### 9.3 Apêndice 3

Sumário de genes identificados como significativamente alterados nas BOECs de pacientes com anemia falciforme em relação às BOECs de indivíduos-controle em condição basal e após estímulo com TNF- $\alpha$ , detectados por PCR *array*.

| <b>Genes</b>   | <b>Diferença de <i>fold change</i> em relação à BOEC Con</b> |                                |
|----------------|--------------------------------------------------------------|--------------------------------|
|                | <b>BOEC AF<br/>(N=9)</b>                                     | <b>BOEC AF + TNF<br/>(N=9)</b> |
| Vasodilatação  |                                                              |                                |
| Vasoconstrição |                                                              |                                |
| <i>PTGIS</i>   | ↓0,271**                                                     | -                              |
| Adesão         |                                                              |                                |
| <i>SELE</i>    | ↓0,1705**                                                    | -                              |
| <i>COL18A1</i> | -                                                            | ↓0,485*                        |

BOEC AF: pacientes com anemia falciforme. (↓) genes subexpressos. \*P<0,05 comparado à BOEC Con + TNF e \*\*P<0,01 comparado à BOEC Con. Teste t de Student.

## 9.4 Apêndice 4

Tabela com os símbolos e nomes completos dos genes que compõem a placa *Human Endothelial Cell Biology RT<sup>2</sup> Profiler™ PCR Array* (Qiagen)

| Posição | Unigene   | Banco de gene | Símbolo | Descrição                                                                         |
|---------|-----------|---------------|---------|-----------------------------------------------------------------------------------|
| A01     | Hs.654434 | NM_000789     | ACE     | Angiotensin I converting enzyme (peptidyl-dipeptidase A) 1                        |
| A02     | Hs.404914 | NM_003183     | ADAM17  | ADAM metallopeptidase domain 17                                                   |
| A03     | Hs.19383  | NM_000029     | AGT     | Angiotensinogen (serpin peptidase inhibitor, clade A, member 8)                   |
| A04     | Hs.728754 | NM_031850     | AGTR1   | Angiotensin II receptor, type 1                                                   |
| A05     | Hs.89499  | NM_000698     | ALOX5   | Arachidonate 5-lipoxygenase                                                       |
| A06     | Hs.369675 | NM_001146     | ANGPT1  | Angiopoietin 1                                                                    |
| A07     | Hs.480653 | NM_001154     | ANXA5   | Annexin A5                                                                        |
| A08     | Hs.654439 | NM_000041     | APOE    | Apolipoprotein E                                                                  |
| A09     | Hs.624291 | NM_004324     | BAX     | BCL2-associated X protein                                                         |
| A10     | Hs.150749 | NM_000633     | BCL2    | B-cell CLL/lymphoma 2                                                             |
| A11     | Hs.516966 | NM_138578     | BCL2L1  | BCL2-like 1                                                                       |
| A12     | Hs.37058  | NM_001741     | CALCA   | Calcitonin-related polypeptide alpha                                              |
| B01     | Hs.2490   | NM_033292     | CASP1   | Caspase 1, apoptosis-related cysteine peptidase (interleukin 1, beta, convertase) |
| B02     | Hs.141125 | NM_004346     | CASP3   | Caspase 3, apoptosis-related cysteine peptidase                                   |
| B03     | Hs.74034  | NM_001753     | CAV1    | Caveolin 1, caveolae protein, 22kDa                                               |
| B04     | Hs.303649 | NM_002982     | CCL2    | Chemokine (C-C motif) ligand 2                                                    |
| B05     | Hs.514821 | NM_002985     | CCL5    | Chemokine (C-C motif) ligand 5                                                    |
| B06     | Hs.76206  | NM_001795     | CDH5    | Cadherin 5, type 2 (vascular endothelium)                                         |
| B07     | Hs.390736 | NM_003879     | CFLAR   | CASP8 and FADD-like apoptosis regulator                                           |
| B08     | Hs.517356 | NM_030582     | COL18A1 | Collagen, type XVIII, alpha 1                                                     |
| B09     | Hs.531668 | NM_002996     | CX3CL1  | Chemokine (C-X3-C motif) ligand 1                                                 |
| B10     | Hs.511899 | NM_001955     | EDN1    | Endothelin 1                                                                      |
| B11     | Hs.1407   | NM_001956     | EDN2    | Endothelin 2                                                                      |
| B12     | Hs.183713 | NM_001957     | EDNRA   | Endothelin receptor type A                                                        |
| C01     | Hs.76753  | NM_000118     | ENG     | Endoglin                                                                          |
| C02     | Hs.482562 | NM_001992     | F2R     | Coagulation factor II (thrombin) receptor                                         |
| C03     | Hs.62192  | NM_001993     | F3      | Coagulation factor III (thromboplastin, tissue                                    |

|     |           |           |       |                                                                                                          |
|-----|-----------|-----------|-------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|     |           |           |       | factor)                                                                                                  |
| C04 | Hs.244139 | NM_000043 | FAS   | Fas (TNF receptor superfamily, member 6)                                                                 |
| C05 | Hs.2007   | NM_000639 | FASLG | Fas ligand (TNF superfamily, member 6)                                                                   |
| C06 | Hs.483635 | NM_000800 | FGF1  | Fibroblast growth factor 1 (acidic)                                                                      |
| C07 | Hs.284244 | NM_002006 | FGF2  | Fibroblast growth factor 2 (basic)                                                                       |
| C08 | Hs.654360 | NM_002019 | FLT1  | Fms-related tyrosine kinase 1 (vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor receptor) |
| C09 | Hs.203717 | NM_002026 | FN1   | Fibronectin 1                                                                                            |
| C10 | Hs.597216 | NM_001530 | HIF1A | Hypoxia inducible factor 1, alpha subunit (basic helix-loop-helix transcription factor)                  |
| C11 | Hs.517581 | NM_002133 | HMOX1 | Heme oxygenase (decycling) 1                                                                             |
| C12 | Hs.643447 | NM_000201 | ICAM1 | Intercellular adhesion molecule 1                                                                        |
| D01 | Hs.467304 | NM_000641 | IL11  | Interleukin 11                                                                                           |
| D02 | Hs.126256 | NM_000576 | IL1B  | Interleukin 1, beta                                                                                      |
| D03 | Hs.694    | NM_000588 | IL3   | Interleukin 3 (colony-stimulating factor, multiple)                                                      |
| D04 | Hs.654458 | NM_000600 | IL6   | Interleukin 6 (interferon, beta 2)                                                                       |
| D05 | Hs.591873 | NM_000880 | IL7   | Interleukin 7                                                                                            |
| D06 | Hs.505654 | NM_002205 | ITGA5 | Integrin, alpha 5 (fibronectin receptor, alpha polypeptide)                                              |
| D07 | Hs.436873 | NM_002210 | ITGAV | Integrin, alpha V (vitronectin receptor, alpha polypeptide, antigen CD51)                                |
| D08 | Hs.643813 | NM_002211 | ITGB1 | Integrin, beta 1 (fibronectin receptor, beta polypeptide, antigen CD29 includes MDF2, MSK12)             |
| D09 | Hs.218040 | NM_000212 | ITGB3 | Integrin, beta 3 (platelet glycoprotein IIIa, antigen CD61)                                              |
| D10 | Hs.479756 | NM_002253 | KDR   | Kinase insert domain receptor (a type III receptor tyrosine kinase)                                      |
| D11 | Hs.479754 | NM_000222 | KIT   | V-kit Hardy-Zuckerman 4 feline sarcoma viral oncogene homolog                                            |
| D12 | Hs.171995 | NM_001648 | KLK3  | Kallikrein-related peptidase 3                                                                           |
| E01 | Hs.83169  | NM_002421 | MMP1  | Matrix metalloproteinase 1 (interstitial collagenase)                                                    |
| E02 | Hs.513617 | NM_004530 | MMP2  | Matrix metalloproteinase 2 (gelatinase A, 72kDa gelatinase, 72kDa type IV collagenase)                   |

|     |           |           |          |                                                                                               |
|-----|-----------|-----------|----------|-----------------------------------------------------------------------------------------------|
| E03 | Hs.297413 | NM_004994 | MMP9     | Matrix metalloproteinase 9 (gelatinase B, 92kDa gelatinase, 92kDa type IV collagenase)        |
| E04 | Hs.707978 | NM_000603 | NOS3     | Nitric oxide synthase 3 (endothelial cell)                                                    |
| E05 | Hs.219140 | NM_002521 | NPPB     | Natriuretic peptide B                                                                         |
| E06 | Hs.490330 | NM_000906 | NPR1     | Natriuretic peptide receptor A/guanylate cyclase A (atrionatriuretic peptide receptor A)      |
| E07 | Hs.592605 | NM_002538 | OCLN     | Occludin                                                                                      |
| E08 | Hs.74615  | NM_006206 | PDGFRA   | Platelet-derived growth factor receptor, alpha polypeptide                                    |
| E09 | Hs.514412 | NM_000442 | PECAM1   | Platelet/endothelial cell adhesion molecule                                                   |
| E10 | Hs.81564  | NM_002619 | PF4      | Platelet factor 4                                                                             |
| E11 | Hs.252820 | NM_002632 | PGF      | Placental growth factor                                                                       |
| E12 | Hs.491582 | NM_000930 | PLAT     | Plasminogen activator, tissue                                                                 |
| F01 | Hs.77274  | NM_002658 | PLAU     | Plasminogen activator, urokinase                                                              |
| F02 | Hs.143436 | NM_000301 | PLG      | Plasminogen                                                                                   |
| F03 | Hs.647450 | NM_006404 | PROCR    | Protein C receptor, endothelial                                                               |
| F04 | Hs.302085 | NM_000961 | PTGIS    | Prostaglandin I2 (prostacyclin) synthase                                                      |
| F05 | Hs.196384 | NM_000963 | PTGS2    | Prostaglandin-endoperoxide synthase 2 (prostaglandin G/H synthase and cyclooxygenase)         |
| F06 | Hs.395482 | NM_005607 | PTK2     | PTK2 protein tyrosine kinase 2                                                                |
| F07 | Hs.89546  | NM_000450 | SELE     | Selectin E                                                                                    |
| F08 | Hs.728756 | NM_000655 | SELL     | Selectin L                                                                                    |
| F09 | Hs.591014 | NM_003006 | SELPLG   | Selectin P ligand                                                                             |
| F10 | Hs.414795 | NM_000602 | SERPINE1 | Serpin peptidase inhibitor, clade E (nexin, plasminogen activator inhibitor type 1), member 1 |
| F11 | Hs.443914 | NM_000454 | SOD1     | Superoxide dismutase 1, soluble                                                               |
| F12 | Hs.68061  | NM_021972 | SPHK1    | Sphingosine kinase 1                                                                          |
| G01 | Hs.89640  | NM_000459 | TEK      | TEK tyrosine kinase, endothelial                                                              |
| G02 | Hs.516578 | NM_006287 | TFPI     | Tissue factor pathway inhibitor (lipoprotein-associated coagulation inhibitor)                |
| G03 | Hs.645227 | NM_000660 | TGFB1    | Transforming growth factor, beta 1                                                            |
| G04 | Hs.2030   | NM_000361 | THBD     | Thrombomodulin                                                                                |
| G05 | Hs.164226 | NM_003246 | THBS1    | Thrombospondin 1                                                                              |
| G06 | Hs.522632 | NM_003254 | TIMP1    | TIMP metalloproteinase                                                                        |

|     |           |           |         |                                                       |
|-----|-----------|-----------|---------|-------------------------------------------------------|
|     |           |           |         | inhibitor 1                                           |
| G07 | Hs.241570 | NM_000594 | TNF     | Tumor necrosis factor                                 |
| G08 | Hs.478275 | NM_003810 | TNFSF10 | Tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 10 |
| G09 | Hs.592212 | NM_001953 | TYMP    | Thymidine phosphorylase                               |
| G10 | Hs.109225 | NM_001078 | VCAM1   | Vascular cell adhesion molecule 1                     |
| G11 | Hs.73793  | NM_003376 | VEGFA   | Vascular endothelial growth factor A                  |
| G12 | Hs.440848 | NM_000552 | VWF     | Von Willebrand factor                                 |
| H01 | Hs.520640 | NM_001101 | ACTB    | Actin, beta                                           |
| H02 | Hs.534255 | NM_004048 | B2M     | Beta-2-microglobulin                                  |
| H03 | Hs.592355 | NM_002046 | GAPDH   | Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase              |
| H04 | Hs.412707 | NM_000194 | HPRT1   | Hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1              |
| H05 | Hs.546285 | NM_001002 | RPLP0   | Ribosomal protein, large, P0                          |
| H06 | N/A       | SA_00105  | HGDC    | Human Genomic DNA Contamination                       |
| H07 | N/A       | SA_00104  | RTC     | Reverse Transcription Control                         |
| H08 | N/A       | SA_00104  | RTC     | Reverse Transcription Control                         |
| H09 | N/A       | SA_00104  | RTC     | Reverse Transcription Control                         |
| H10 | N/A       | SA_00103  | PPC     | Positive PCR Control                                  |
| H11 | N/A       | SA_00103  | PPC     | Positive PCR Control                                  |
| H12 | N/A       | SA_00103  | PPC     | Positive PCR Control                                  |

## 9.5 Apêndice 5

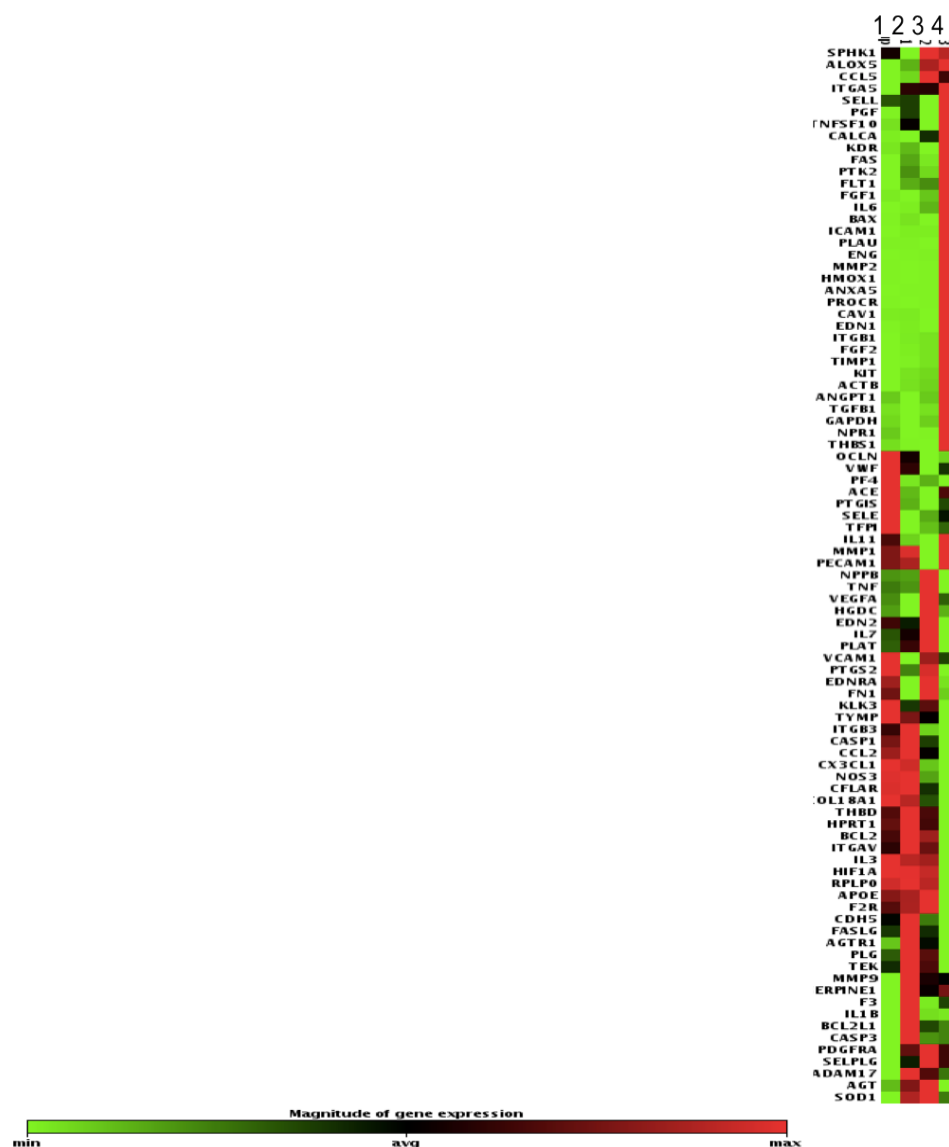


Gráfico de clusterização dos genes avaliados pelo PCR *array*. **1:** BOEC Con (indivíduos-controle, N=3); **2:** BOEC SS (pacientes AF sem HU, N=3); **3:** BOEC SSHU (pacientes AF com HU N=3); **4:** BOEC SStrf (pacientes AF em transfusão, N=3). A cor vermelha denota maior expressão e a cor verde menor expressão gênica.

## 9.6 Apêndice 6

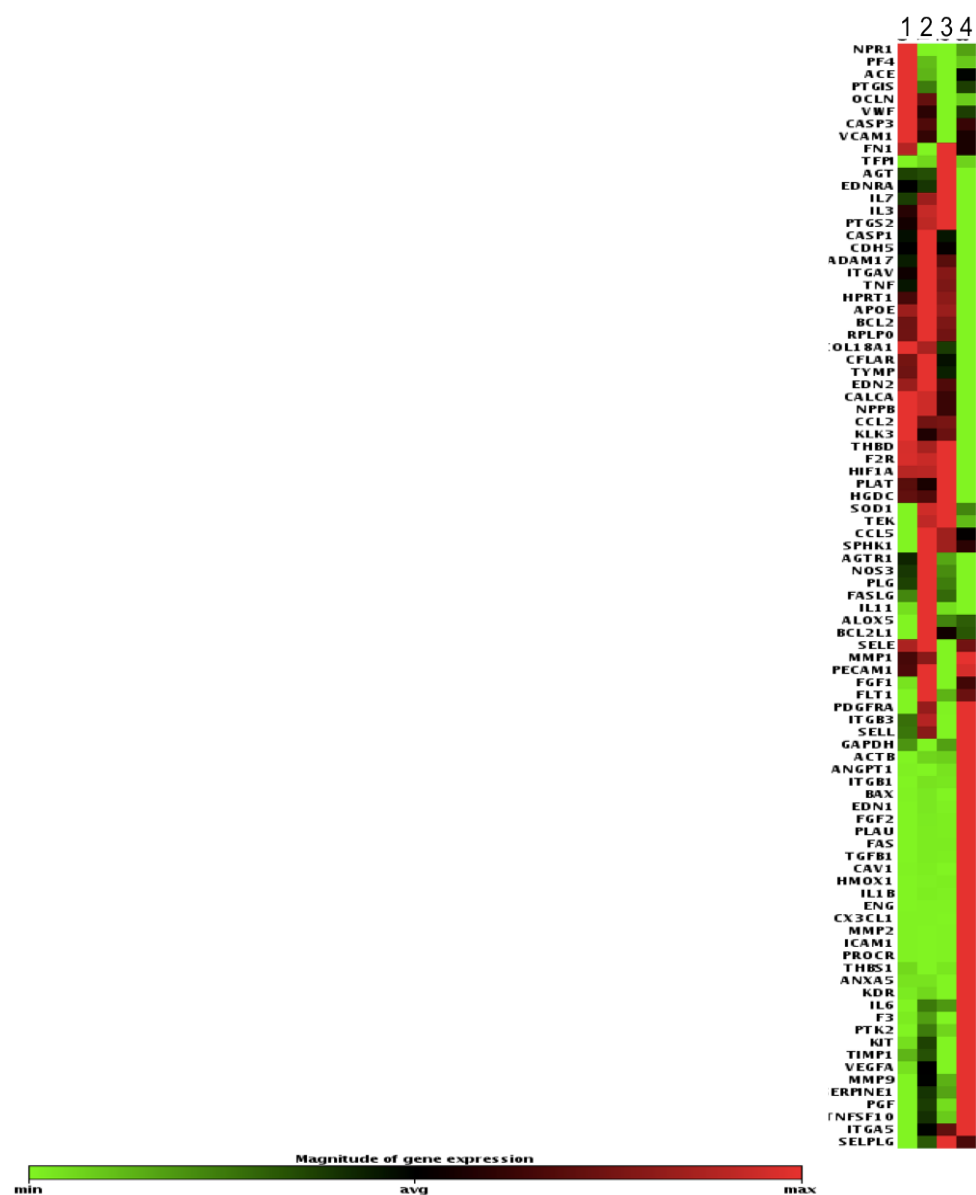


Gráfico de clusterização dos genes avaliados pelo PCR *array*. **1:** BOEC Con (indivíduos-controle, N=3); **2:** BOEC SS (pacientes AF sem HU, N=3); **3:** BOEC SSHU (pacientes AF com HU N=3); **4:** BOEC SSTrf (pacientes AF em transfusão, N=3), após tratamento com TNF- $\alpha$  (10ng/mL, 3h, 37<sup>0</sup>C, 5%CO<sub>2</sub>). A cor vermelha denota maior expressão e a cor verde menor expressão gênica.