

ALINE MORANDI ALESSIO

**AVALIAÇÃO DAS CÉLULAS ENDOTELIAIS
CIRCULANTES NA TROMBOSE VENOSA PROFUNDA:
PACIENTES E MODELO ANIMAL**

CAMPINAS

2010

ALINE MORANDI ALESSIO

**AVALIAÇÃO DAS CÉLULAS ENDOTELIAIS
CIRCULANTES NA TROMBOSE VENOSA PROFUNDA:
PACIENTES E MODELO ANIMAL**

Dissertação de Doutorado apresentada à Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas para obtenção de título de Doutor em Fisiopatologia Médica, na área de concentração em Medicina Experimental.

ORIENTADORA: *Profa. Dra. Joyce Maria Annichino-Bizzacchi*

CAMPINAS

2010

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DA
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DA UNICAMP**

Bibliotecário: Sandra Lúcia Pereira – CRB-8ª / 6044

Al25a Alessio, Aline Morandi
Avaliação das células endoteliais circulantes na trombose venosa profunda: pacientes e modelos animais / Aline Morandi Alessio. Campinas, SP : [s.n.], 2010.

Orientador : Joyce Maria Anichinno-Bizzacchi
Tese (Doutorado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.

1. Célula endotelial. 2. Trombose venosa. 3. Modelo experimental. I. Anichinno-Bizzacchi, Joyce Maria. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Título em inglês : Evaluation of the circulating endothelial cell in deep venous thrombosis: patients and animal model

Keywords: • Endothelial cell
• Venous Thrombosis
• Experimental model

Titulação: Doutor em Fisiopatologia Médica

Área de concentração: Medicina Experimental

Banca examinadora:

Prof^ª. Dr^ª. Joyce Maria Anicchinno-Bizzacchi

Prof^ª. Dr^ª. Vânia Morelli

Prof^ª. Dr^ª. Paula Villaça

Prof^ª. Dr^ª. Cristina Pontes Vicente

Prof^ª. Dr^ª. Sara Teresinha Olalla Saad

Data da defesa: 28-09-2010

Banca examinadora da tese de Doutorado

Aline Morandi Alessio

Orientador(a) : Prof(a). Dr(a). Joyce Maria Annichino Bizzacchi

Membros:

1. Prof(a). Dr(a). Joyce Maria Annichino Bizzacchi

2. Prof(a). Dr(a). Sara Teresinha Olalla Saad

3. Prof(a). Dr(a). Cristina Pontes Vicente

4. Prof(a). Dr(a). Vânia Maris Morelli

5. Prof(a). Dr(a). Paula Villaça

Handwritten signatures of the five members of the exam board, corresponding to the list on the left. The signatures are: 1. Joyce Maria Annichino Bizzacchi, 2. Sara Teresinha Olalla Saad, 3. Cristina Pontes Vicente, 4. Vânia Maris Morelli, and 5. Paula Villaça.

Curso de pós-graduação em Fisiopatologia Médica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 28/09/2010

"Mas por quê seria necessário para o homem na Terra, adquirir um nível superior de consciência?"

Isso é realmente uma questão crucial, e eu não acho que a resposta seja fácil. Ao invés de uma resposta concreta eu posso apenas fazer uma confissão de fé. Acredito que alguém, depois de milhões de anos, tinha que perceber que esse mundo maravilhoso de montanhas e oceanos, sóis e luas, galáxias e nebulosas, plantas e animais, existem.

Certa vez, de um monte nas planícies do Leste da África, eu observei vastas manadas de animais selvagens pastando em silenciosa imobilidade, tal como haviam feito desde tempos imemoriais, tocados apenas pelo sopro de um mundo primitivo. Eu me senti então como se fosse o primeiro homem, a primeira criatura a saber que tudo isso é. E então, naquele exato momento em que me dei conta, o mundo passou a ser. Sem aquele momento o mundo nunca teria sido.

Toda a Natureza busca esse objetivo e o encontra realizado no homem, mas apenas naquele homem mais altamente desenvolvido e mais completamente consciente. Todo avanço, mesmo o menor deles, ao longo desse caminho de realização consciente, acrescenta algo ao mundo."

Carl Gustav Jung

DEDICATÓRIA

*Aos meus pais, Luíz Eduardo e Cláudia, exemplos de
Vida e Amor incondicional.*

*Aos meus irmãos, Luíz Eduardo Júnior e Ana Cláudia,
pela amizade e incentivo.*

*A minha orientadora, Dra. Joyce, pela confiança e
oportunidade de crescimento profissional e pessoal.*

AGRADECIMENTOS

A Deus, nosso Criador.

A todos meus Amigos, pelo carinho, apoio, incentivo e amizade.

Aos funcionários e amigos do Laboratório de Biologia Molecular em Hemostasia, Cristina, Lúcia Helena, Silmara, Tânia, Susan, Ricardo, Luis Fernando, Mariane, Bruna, Josie, Aline, Fernanda, Carolina, Kiara, Eloá, pela amizade e ajuda constante na realização deste trabalho.

A Devanira de Souza, Carla Pazzini e Lucas Gobin pela amizade e auxílio na realização do modelo animal.

Aos funcionários e amigos do Laboratório de Marcadores Celulares, Profa. Dra. Irene Lorand-Metze, Fernanda, Rosângela, Suellen, pela realização da citometria de fluxo, paciência e ensinamentos.

A Miriam Beltrame, pela colaboração e ensinamentos na área de citometria de fluxo, amizade, disponibilidade, atenção e carinho.

Aos docentes, membros titulares e suplentes da banca de Qualificação, Dr. Erich Vinícius de Paula, Dra. Fátima Sonatti, Dra. Cristina Vicente, Dra. Íscia Cendes pela atenção, sugestões, disponibilidade e ensinamentos.

Aos docentes, membros titulares e suplentes da banca de Defesa, Dra. Sara Saad, Dra. Cristina Vicente, Dra. Vânia Morelli, Dra. Paula Villaça, Dra. Dayse Lourenço, Dr. Erich Vinícius de Paula, Dr. Andrey dos Santos, pela prontidão e disponibilidade.

Ao Prof. Dr. Cláudio Chrysóstomo Werneck, do Laboratório de Fibras Elásticas, pelos ensinamentos, sugestões e auxílio na padronização do modelo animal em camundongos.

A Prof^a Dra. Cristina Vicente, Juliana e Daniel, do Laboratório de Estudos Aterosclerose e Trombose, pela paciência, colaboração e realização da imunohistoquímica.

A Junia Martins, do Laboratório de Fisiologia, pela dedicação e realização dos cortes histológicos.

Aos funcionários, residentes e Médicos do Pronto Atendimento do Hospital das Clínicas e do Serviço de Raios-X da UNICAMP, do Hospital Municipal Dr. Mario Gatti e do Hospital Estadual de Sumaré pela colaboração e ajuda na seleção dos pacientes.

A Dra. Fernanda Orsi, do Ambulatório de Hematologia pelo auxílio na seleção dos pacientes.

Aos funcionários do Serviço de Coleta do Hemocentro, pela realização das coletas de sangue dos pacientes do Ambulatório de Hematologia.

Aos funcionários do Apoio Didático do Hemocentro, Arlete, Leonardo, Gustavo, pela confecção de pôster e impressão de relatórios.

Ao Roberto Zulli pela análise estatística, disponibilidade, atenção e ensinamentos.

As secretárias do Hemocentro, Patrícia, Raquel e Nicete, pela ajuda e atenção.

A todos os funcionários do Hemocentro que direta ou indiretamente auxiliaram na realização deste trabalho.

Aos funcionários do Núcleo de Medicina Experimental, Willian e Ana, pelo esclarecimento de dúvidas e auxílio na padronização do modelo animal em ratos.

As secretárias do Departamento de Fisiopatologia Médica e da Pós-graduação da Faculdade de Ciências Médicas, Salete e Márcia, pela atenção, paciência e ajuda.

A Ruth Hissae Kanayama do Hospital Albert Einstein, pela disponibilidade e auxílio na padronização de técnicas de citometria.

Aos funcionários do CEMIB, Regina e Érica, pela atenção e competência.

Aos voluntários que participaram do estudo, sem os quais seria impossível a realização deste trabalho.

Aos animais, ratos e camundongos, cujo sacrifício foi necessário para este estudo.

A Dra. Patrizia Mancuso, do Instituto Europeu de Oncologia, pela atenção e disponibilização do seu protocolo de pesquisa.

Ao Dr. Philippe Poncelet, Diretor Científico da Biocytex, pela atenção, disponibilidade, paciência, incentivo e ensinamentos.

Ao Dr. Sérgio Dias, do Instituto Português de Oncologia, pela oportunidade de reflexão sobre pesquisa científica.

Este trabalho foi realizado com o apoio financeiro da FAPESP, Bolsa de Doutorado (Processo: 2006/55178-5) e Auxílio à Pesquisa (Processo: 2006/56256-0)

RESUMO

As células endoteliais participam da hemostasia com efeitos pró e antitrombóticos, que podem ser estimulados por uma lesão endotelial. A presença de células endoteliais na circulação pode ser considerada um novo marcador de integridade vascular, como já descrito em várias patologias tais como: doenças cardiovasculares, doenças infecciosas, doenças imunes, transplantes, anemia falciforme. Os objetivos do nosso estudo foram: padronizar a identificação e quantificação das células endoteliais circulantes (CECs) e das células endoteliais progenitoras (CEPs) em um grupo de pacientes com trombose venosa profunda (TVP) ao diagnóstico (aguda, 1ª coleta) e após no mínimo 6 meses (2ª coleta), em um grupo de TVP crônica e em um grupo controle; padronizar um modelo animal de TVP induzida por lesão endotelial para avaliar as CECs e CEPs no sangue periférico e no trombo venoso. O grupo de TVP aguda foi composto por 9 pacientes [F: 7; M: 2; 45 anos (26 – 54 anos)], sendo recrutados 6 indivíduos para uma 2ª coleta [F: 5; M: 1; 47,5 anos (27 – 55 anos)], no grupo de TVP crônica foram incluídos 10 pacientes [F: 6; M: 4; 44,5 anos (28 – 56 anos)] e no grupo controle 11 voluntários [F: 9; M: 2; 29 anos (21 – 52 anos)]. A identificação das CECs e CEPs no sangue periférico foi realizada por citometria de fluxo. No modelo animal, a TVP foi induzida por lesão endotelial com uma solução de FeCl₃ a 15%. Após a indução da TVP as CECs e CEPs foram avaliadas no sangue periférico nos tempos: 15 minutos, 30 minutos, 45 minutos, 1 hora, 24 horas, 48 horas e 72 horas. O trombo venoso formado na veia cava inferior (VCI) foi avaliado pela coloração de Verhoff van Gienson e a presença de CECs e CEPs por imunofluorescência. Houve uma diferença estatística no número das CECs (P=0.001, CD31⁺CD144⁺CD45^{dim}CD133⁻; P<0.001, CD31⁺CD146⁺CD45^{dim}CD133⁻; P=0.002, CD31⁺VEGFR2⁺CD45^{dim}CD133⁻) entre os grupos estudados, com um aumento importante nos pacientes com TVP aguda. Os grupos de TVP crônica e TVP 2ª coleta mostraram um aumento significativo de CECs em relação aos controles. Não houve diferença estatística no número das CEPs (CD34⁺VEGFR2⁺CD45^{dim}CD133⁻) entre os grupos estudados, porém observou-se um aumento no grupo de TVP aguda. No modelo animal, a oclusão total da VCI foi verificada entre 15 minutos e 1 hora. Após 24 horas ocorreu uma diminuição progressiva da área do trombo formado [85,4% (24h); 65,4% (48h); 51,3% (72h)], e não foram observadas CECs e CEPs no mesmo. No sangue periférico, no tempo de 48 horas houve um aumento importante de CECs e CEPs quando comparado com os outros tempos estudados (P=0.001,

Sca1⁻VEGFR2⁺CD45^{dim}; P=0.004, CD34⁻VEGFR2⁺CD45^{dim}; P<0.001, Sca1⁺VEGFR2⁺CD45^{dim}; P<0.001, CD34⁺VEGFR2⁺CD45^{dim}). Os resultados observados em camundongos e humanos sugerem que as CEPs podem ser recrutadas da medula óssea para a circulação, participando do processo de reparo endotelial. O aumento de CECs na fase em que se inicia o processo de recanalização no modelo animal, sugere que apesar da lesão endotelial inicial, as mesmas somente são liberadas quando o fluxo começa a ser restabelecido. Neste estudo concluímos que as CECs podem constituir um marcador de dano vascular.

ABSTRACT

Endothelial cells participate in hemostasia and have pro and anti –thrombotic effects which can be stimulated by an endothelial lesion. The presence of endothelial cells in circulation can be considered a novel marker of vascular integrity, as described in several pathologies, such as: cardiovascular disease, infectious disease, immune diseases, transplants, and sickle cell anemia. The aims of our study were to: standardize the identification and quantification of circulating endothelial cells (CECs) and progenitor endothelial cells (EPCs) in a group of patients with Deep Vein Thrombosis (DVT) at diagnosis (acute, 1st collection) and after a minimum of six months (2nd collection), in a group with chronic DVT and in a control group; standardize an animal model with DVT induced by endothelial lesion in order to evaluate CECs and EPCs in peripheral blood and in venous thrombosis. The group of DVT was composed of 9 patients [F: 7; M: 2; 45 years old (y.o.) (26 – 54 y.o.)], of which six individuals were recruited for the 2nd collection [F: 5; M: 1; 47.5 y.o. (27 – 55 y.o.)]; in the chronic DVT group 10 patients were included [F: 6; M: 4; 44.5 y.o. (28 – 56 y.o.)]; and in the control group 11 volunteers were included [F: 9; M: 2; 29 y.o. (21 – 52 y.o.)]. The identification of CECs and EPCs in peripheral blood was carried out by flow cytometry. DVT was induced in the animal model by endothelial lesion using a FeCl₃ solution at 15%. After DVT induction, CECs and EPCs were evaluated in peripheral blood at: 15 minutes, 30 minutes, 45 minutes, 1 hour, 24 hours, 48 hours and 72 hours. The venous thrombus formed in the inferior cava vein (ICV) was evaluated using Verhoff van Gienson stain and the presence of CECs and EPCs was evaluated using immunofluorescence. There was a statistical difference in the number of CECs ($P=0.001$, CD31⁺CD144⁺CD45^{dim}CD133⁻; $P<0.001$, CD31⁺CD146⁺CD45^{dim}CD133⁻; $P=0.002$, CD31⁺VEGFR2⁺CD45^{dim}CD133⁻) between the groups studied, with a significant increase in acute DVT patients. The chronic DVT and 2nd collection DVT groups demonstrated a significant increase in CECs in relation to the controls. There was no statistical difference in the number of EPCs (CD34⁺VEGFR2⁺CD45^{dim}CD133⁻) among the groups studied, however an increase in the acute DVT group was observed. In the animal model, total ICV occlusion was observed between 15 minutes and 1 hour. After 24 hours a progressive decrease in the area of the formed thrombus occurred [85.4% (24h); 65.4% (48h); 51.3% (72h)], and no CECs or CEPs were observed. After 48hours, there was a significant increase in CECs and EPCs in peripheral blood when compared to other periods studied ($P=0.001$, Sca1⁻VEGFR2⁺

CD45^{dim}; $P=0.004$, CD34⁻VEGFR2⁺CD45^{dim}; $P<0.001$, Sca1⁺VEGFR2⁺CD45^{dim}; $P<0.001$, CD34⁺VEGFR2⁺CD45^{dim}). The results observed in mice and human beings suggest that EPCs can be recruited to circulation from the bone marrow, participating in a process of endothelial repair. The increase of CECs during the phase when the re-channeling process begins in the animal model, suggests that despite the initial endothelial lesion, CECs are liberated when the flow is reestablished. In the present study we concluded that CECs can represent a vascular damage marker.

LISTA DE ABREVIATURAS

APC	Aloficocianina
AVCi	Acidente vascular cerebral isquêmico
BSA	Soro albumina bovina
CEC	Célula endotelial circulante
CEP	Célula endotelial progenitora
FeCl₃	Cloreto férrico
FITC	Fluoresceína
IAM	Infarto agudo do miocárdio
TVP	Trombose venosa profunda
PAI-1	Inibidor do t-PA
PBS	Tampão fosfato
PE	Ficoeritrina
PerCP	Proteína clorofila peridina
TVP	Trombose venosa profunda
t-PA	Ativador tecidual do plasminogênio
VCI	Veia cava inferior
VEGFR2	Fator de crescimento endotelial vascular, receptor 2
VvG	Verhoff van Gienson

LISTA DE TABELAS

	<i>Pág.</i>
Tabela 1 - Descrição das populações de CECs e CEPs em humanos de acordo com o painel de anticorpos utilizados.....	37
Tabela 2 - Descrição das populações de CECs e CEPs para camundongos de acordo com o painel de anticorpos utilizados.....	44
Tabela 3 - Características clínicas dos grupos: controle, TVP aguda 1 ^a coleta, TVP aguda 2 ^a coleta, TVP crônica.....	49
Tabela 4 - Fatores de risco pessoal e familiar para doença arterial nos grupos: controle, TVP aguda 1 ^a coleta, TVP aguda 2 ^a coleta e TVP crônica...	51
Tabela 5 - Resultado do hemograma dos grupos: controle, TVP aguda 1 ^a coleta, TVP aguda 2 ^a coleta e TVP crônica.....	52
Tabela 6 - Número das CEC/ μ L nos grupos: controle, TVP aguda 1 ^a coleta, TVP aguda 2 ^a coleta e TVP crônica.....	54
Tabela 7 - Número das CEP/ μ L nos grupos: controle, TVP aguda 1 ^a coleta, TVP aguda 2 ^a coleta e TVP crônica.....	58
Tabela 8 - Peso da peça cirúrgica (g) nos intervalos de tempo estudados.....	60
Tabela 9 - Porcentagem das CECs nos intervalos de tempo avaliados.....	63
Tabela 10 - Porcentagem das CEPs nos intervalos de tempo avaliados.....	66

LISTA DE FIGURAS

	<i>Pág.</i>	
Figuras 1 a-g.	Estratégia de Análise das CECs e CEPs em humano. (a-b) <i>Dot plot</i> FSC x SSC. (c) <i>Dot plot</i> CD45 x SSC. (d) <i>Dot plot</i> CD31 x CD45. (e) <i>Dot plot</i> VEGFR2 x SSC. (f) <i>Dot plot</i> CD133 x SSC. (g) <i>Dot Plot</i> CD31 x VEGFR2.....	38
Figuras 2 a-c.	(a) Cavidade abdominal aberta e VCI isolada. (b) Papel filtro pré-saturado com solução FeCl ₃ sobre a VCI. (c) Ultra-som colocado na VCI.....	41
Figura 3.	Coleta do sangue periférico do camundongo por punção cardíaca.....	41
Figuras 4 a-d.	(a) Ausência do trombo na VCI. (b) Início da formação do trombo na VCI. (c) Evolução do trombo formado na VCI. (d) Oclusão da VCI pelo trombo.....	43
Figura 5.	Estratégia de Análise das CECs e CEPs em camungongo. <i>Dot plot</i> Sca1 x VEGFR2.....	45
Figura 6.	Representação gráfica do número das CECs (CD31 ⁺ CD144 ⁺ CD45 ^{dim} CD133 ⁻) de cada indivíduo e mediana em cada um dos grupos estudados.....	55
Figura 7.	Representação gráfica do número das CECs (CD31 ⁺ CD144 ⁺ CD45 ^{dim} CD133 ⁻) de cada indivíduo do grupo de TVP aguda na 1 ^a coleta e na 2 ^a coleta.....	55
Figura 8.	Representação gráfica do número de CECs (CD31 ⁺ CD146 ⁺ CD45 ^{dim} CD133 ⁻) de cada indivíduo e mediana em cada um dos grupos estudados.....	56
Figura 9.	Representação gráfica do número das CECs (CD31 ⁺ CD146 ⁺ CD45 ^{dim} CD133 ⁻) de cada indivíduo do grupo de TVP aguda na 1 ^a coleta e na 2 ^a coleta.....	57
Figura 10.	Representação gráfica do número de CECs (CD31 ⁺ VEGFR2 ⁺ CD45 ^{dim} CD133 ⁻) de cada indivíduo e mediana em cada um dos	

	grupos estudados.....	57
Figura 11.	Representação gráfica do número das CECs (CD31 ⁺ VEGFR2 ⁺ CD45 ^{dim} CD133 ⁻) de cada indivíduo do grupo de TVP aguda na 1 ^a coleta e na 2 ^a coleta.....	58
Figura 12.	Representação gráfica do número das CEPs (CD34 ⁺ VEGFR2 ⁺ CD45 ^{dim} CD133 ⁻) de cada indivíduo e mediana em cada um dos grupos estudados.....	59
Figura 13.	Representação gráfica do peso do trombo (g) de cada camundongo e mediana nos grupos estudados.....	61
Figura 14 a-h.	Visualização da formação do trombo venoso pela coloração de Verhoff van Gienson nos tempos avaliados. (a) controle; (b). 15 minutos; (c) 30 minutos; (d) 45 minutos; (e) 1 hora; (f) 24 horas; (g) 48 horas e (h) 72 horas.....	61
Figura 15.	Representação gráfica da porcentagem das CECs (Sca1 ⁻ VEGFR2 ⁺ CD45 ^{dim}) de cada camundongo e mediana nos grupos estudados.....	64
Figuras 16.	Representação gráfica da porcentagem das CECs (CD34 ⁻ VEGFR2 ⁺ CD45 ^{dim}) de cada camundongo e mediana nos grupos estudados.....	65
Figura 17.	Representação gráfica da porcentagem das CEPs (Sca1 ⁺ VEGFR2 ⁺ CD45 ^{dim}) de cada camundongo e mediana nos grupos estudados.....	67
Figura 18.	Representação gráfica da porcentagem das CEPs (CD34 ⁺ VEGFR-2 ⁺ CD45 ^{dim}) de cada camundongo e mediana nos grupos estudados.....	68
Figura 19 a-h.	Imunofluorescência do trombo venoso (CD31). (a) controle; (b). 15 minutos; (c) 30 minutos; (d) 45 minutos; (e) 1 hora; (f) 24 horas; (g) 48 horas e (h) 72 horas.....	69

SUMÁRIO

	<i>Pág.</i>
RESUMO	X
ABSTRACT	Xii
1 - INTRODUÇÃO	23
1.1 - Endotélio: estrutura, ativação e função	24
1.2 - Células endoteliais circulantes	25
1.3 - Trombose venosa profunda	27
1.4 - Células endoteliais circulantes e trombose venosa	28
1.5- Modelo animal de trombose venosa	29
2 - OBJETIVOS	30
3 - CASUÍSTICA E MÉTODOS	32
3.1 - Casuística	33
3.1.1 – Pacientes com TVP, ao diagnóstico (aguda) - 1ª coleta	33
3.1.1.1 - Critérios de inclusão.....	33
3.1.1.2 - Critérios de exclusão.....	33
3.1.2 – Pacientes com TVP (aguda), avaliação prospectiva - 2ª coleta	33
3.1.2.1 - Critérios de inclusão.....	34
3.1.2.2 - Critérios de exclusão.....	34

3.1.3 – Pacientes com TVP crônica.....	34
3.1.3.1 - Critérios de inclusão.....	34
3.1.3.2 - Critérios de exclusão.....	34
3.1.4 - Controles.....	34
3.1.4.1 - Critérios de inclusão.....	34
3.1.4.2 - Critério de exclusão.....	35
3.2 - Coleta de sangue.....	35
3.3- Quantificação das CECs e CEPs no sangue periférico de humanos.....	35
3.4- Modelo animal de TVP induzido por lesão endotelial com FeCl₃.....	40
3.5- Avaliação do trombo venoso pela coloração de Verhoff van Gienson.....	42
3.6- Quantificação das CECs e CEPs no sangue periférico de camundongos.....	43
3.7- Imunofluorescência para a identificação das CECs e CEPs no trombo venoso.....	45
3.8 - Análise Estatística.....	46
4 – RESULTADOS.....	47
4.1 – Características Clínicas.....	48
4.2 – Hemograma.....	51
4.3 – Análise das CECs no sangue periférico de humanos.....	53
4.4 – Análise das CEPs no sangue periférico de humanos.....	58
4.5 – Modelo animal.....	60

4.5.1 – Peso da peça cirúrgica.....	60
4.5.2 – Avaliação do trombo venoso.....	61
4.6 – Análise das CECs no sangue periférico de camundongo.....	63
4.7 – Análise das CEPs no sangue periférico de camundongo.....	65
4.8 – Identificação das CECs e CEPs no trombo venoso.....	68
5- DISCUSSÃO.....	71
6 - CONCLUSÕES.....	79
7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	82
8 - ANEXOS.....	90
Anexo 1.....	91
Anexo 2.....	93
Anexo 3.....	94
Anexo 4.....	96
Anexo 5.....	97

1 - INTRODUÇÃO

1.1- Endotélio: estrutura, ativação e função

O endotélio é um dos maiores tecidos, consistindo de mais de 10^{14} células que recobrem o sistema vascular. Por estar estrategicamente localizado entre os tecidos e o sangue, têm uma função crucial no controle de várias respostas como a hemostasia, pressão sanguínea e angiogênese (CINES *et al.*, 2001). As células endoteliais são células poligonais que possuem muitas vesículas pinocitóticas e formam complexos juncionais com as células adjacentes formando uma monocamada que reveste todo o sistema vascular. Além disso, são as únicas que contêm corpúsculos de Weibel-Palade, aderidos à membrana, que armazenam o fator de von Willebrand (ROBBINS *et al.*, 1996).

A integridade estrutural e funcional das células endoteliais é um requisito fundamental para a manutenção da hemostasia vascular, e a alteração endotelial pode levar a trombose, hipertensão e edema (BLANN, 2000). As células endoteliais auxiliam e participam de funções metabólicas e reguladoras altamente ativas, incluindo o controle da hemostasia primária, coagulação sanguínea e fibrinólise, interações de plaquetas e leucócitos com a parede do vaso, metabolismo de lipoproteínas, apresentação de antígenos de histocompatibilidade, regulação do tônus muscular, e crescimento além da pressão arterial (VAPAATALO & MERVAALA, 2001).

As células endoteliais intactas, ao contrário das células extravasculares, têm uma ação anticoagulante e antitrombótica. Esse mecanismo envolve a secreção regulada de agentes antiagregantes plaquetários, incluindo prostaciclina e óxido nítrico. Depois da injúria vascular, a adesão das plaquetas à matriz exposta requer o fator de von Willebrand. A geração local de trombina causa uma série de respostas funcionais das células endoteliais, como a ligação com a trombomodulina e conseqüente ativação da via da proteína C. Também ocorre inibição da coagulação pela ligação da antitrombina com os receptores endoteliais *heparin-like* (PEARSON, 2002).

As células endoteliais liberam o ativador tecidual do plasminogênio (t-PA), o inibidor do t-PA (PAI-1), e o inibidor da via do fator tecidual. Em estados patológicos,

muitas dessas propriedades da célula endotelial são perturbadas para um fenótipo procoagulante e pró-trombótico (PEARSON, 2002). As células endoteliais podem, sob várias condições patológicas, apresentar disfunções, como na aterosclerose, hipertensão, insuficiência cardíaca congestiva, hiperhomocisteinemia, diabetes, falência renal, transplante renal e cirrose hepática (VAPAATALO & MERVAALA, 2001).

1.2- Células endoteliais circulantes

Até recentemente, a investigação da integridade do endotélio era realizada através de métodos invasivos, ou indiretamente, por análise de marcadores liberados pelas células endoteliais, como o fator de von Willebrand, trombosmodulina, ou por técnicas fisiológicas, como a análise da vasodilatação mediada pelo fluxo (BLANN, 2000). Contudo, esses marcadores não permitem a distinção entre dano e ativação, e inúmeros fatores, como por exemplo, a função renal pode interferir com suas concentrações plasmáticas. Apesar das células endoteliais circulantes terem sido descritas pela primeira vez em 1970 (BOUVIER *et al.*, 1970; HLADOVEC & ROSSMAN, 1973), somente recentemente foram reconhecidas como um marcador adicional para análise da integridade vascular (DIGNAT-GEORGE & SAMPOL, 2000).

As células endoteliais circulantes compõem uma população de células não hematopoiéticas raras, presentes no sangue periférico. A precisão de sua identificação requer o emprego de um método sensível e específico. Os métodos atualmente utilizados para a identificação das células endoteliais circulantes são a citometria de fluxo e a separação imunomagnética (DIGNAT-GEORGE *et al.*, 2004). As células endoteliais presentes na circulação podem ser oriundas da parede vascular (CECs) ou da medula óssea, denominadas CEPs (ASAHARA *et al.*, 1997). As CEPs podem ser recrutadas em resposta a vários estímulos angiogênicos, como o fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF), isquemia e trauma vascular (RAFII *et al.*, 2002).

A diferenciação entre CEPs e CECs pode ser feita pela análise funcional e/ou fenotípica, por marcadores de membrana. As CEPs co-expressam marcadores imaturos

(CD133) e marcadores endoteliais, como CD31, VE-caderina e, têm a capacidade de formar colônias *in vitro* com alto potencial proliferativo (Asahara *et al.*, 1997; Shi *et al.*, 1998). Outra questão importante reside na identificação da origem anatômica. O marcador CD36 é utilizado para determinar se a CEC é oriunda da micro ou macrocirculação. Quando positivo, indica a origem da microcirculação, como descrito na anemia falciforme e em pacientes com câncer (SOLOVEY *et al.*, 1997; MANCUSO *et al.*, 2001). Nas doenças isquêmicas coronarianas esse marcador foi negativo, sugerindo que as CECs são de origem dos grandes vasos (MUTIN *et al.*, 1999).

Números elevados de CECs foram relatados em várias patologias cardiovasculares, como resultado da injúria mecânica, isquêmica ou hipertensão (SBARBATI *et al.*, 1991; GEORGE *et al.*, 1992; MUTIN *et al.*, 1999; SOLOVEY *et al.*, 1998; BULL *et al.*, 2003; MAKIN *et al.*, 2004). Também foram relatados aumento de CECs em patologias nas quais o endotélio é o alvo dos patógenos, como na riquetsiose (GEORGE *et al.*, 1993), infecção pelo citomegalovírus (PERCIVALLE *et al.*, 1993; GREFTE *et al.*, 1993) e no choque séptico (MUTUNGA *et al.*, 2001). Números aumentados das CECs também foram descritos em associação com doenças imunes: púrpura trombocitopênica trombótica, doença de Behcet, lupus eritematoso sistêmico, doença de Kawasaki e vasculites inflamatórias (LEFEVRE *et al.*, 1993; CAMOIN-JAU *et al.*, 2000; CLANCY *et al.*, 2001; WOYWODT *et al.*, 2003; NAKATANI *et al.*, 2003); e também em transplantes (WOYWODT *et al.*, 2003, 2004), e em pacientes com câncer (MANCUSO *et al.*, 2001).

Devido ao número das CECs ser muito baixo em indivíduos normais, números elevados representam um marcador não invasivo para documentar alterações endoteliais em uma base quantitativa (DIGNAT-GEORGE *et al.*, 2004). Além disso, a análise fenotípica das CECs possibilita a identificação de receptores e proteínas expressas em sua superfície. Assim, é possível determinar se as mesmas circulam em estado ativado, pela análise da expressão do fator tecidual. O fator tecidual é expresso nas CECs de pacientes com síndromes coronarianas agudas ou anemia falciforme (MUTIN *et al.*, 1999; SOLOVEY *et al.*, 1998), sugerindo que elas podem participar na ativação da via do fator tecidual. A

importância clínica deste achado é desconhecida, mas é tentador especular que algumas CECs contribuem para os processos patológicos pela ativação da coagulação.

Portanto, a literatura evidencia claramente que as CECs podem ser consideradas marcadores para avaliar a lesão endotelial mural, além de representar uma oportunidade para estudar o fenótipo e as funções do endotélio, e explorar suas alterações.

1.3 - Trombose venosa profunda

A trombose é definida como um processo patológico resultante da ativação e propagação inapropriada da resposta hemostática normal do organismo, podendo envolver tanto o território venoso quanto o arterial. A trombose venosa profunda (TVP) é considerada uma doença comum, com incidência de 1 a 3 casos por 1000 indivíduos ao ano (SILVERSTEIN *et al.*, 1998; HANSON *et al.*, 1997). No Brasil é descrita uma prevalência de 0,6 casos por 1000 indivíduos ao ano (MAFFEI, 1998).

A trombofilia é caracterizada como uma tendência à formação de trombos, decorrentes de fatores de risco genéticos e/ou adquiridos. Os fatores de risco adquiridos são representados por certas condições como imobilização, gravidez, câncer, anticoncepcional hormonal, terapia de reposição hormonal, trauma, cirurgia, presença de anticorpo antifosfolípido, entre outros (ROSENDAAL, 1999; ROBETORYE & RODGERS, 2001).

A trombofilia hereditária caracteriza-se por defeitos genéticos em um ou mais mecanismos da hemostasia, sendo decorrentes da deficiência de proteína C, proteína S, antitrombina, mutação G1691A no gene do fator V (FV de Leiden), mutação G20210A no gene da protrombina e disfibrinogenemia. Estas alterações manifestam-se mais freqüentemente por fenômenos tromboembólicos venosos, que em muitas ocasiões são desencadeados por fatores de risco adquiridos (ROSENDAAL, 1999; ROBERTORYE & RODGERS, 2001).

Nos últimos anos, outras anormalidades da coagulação têm sido descritas como potencialmente trombogênicas. Estas condições são representadas por níveis elevados de certos fatores da coagulação: fibrinogênio, fatores VIII, IX e XI (ROSENDAAL, 2005). O

aumento dos níveis plasmáticos destas proteínas levaria a uma excessiva geração de trombina, e conseqüente formação do coágulo de fibrina.

Estudos realizados pelo nosso grupo de pesquisa também confirmaram esses fatores de risco na população brasileira (MELLO *et al.*, 2008; 2009; 2010).

1.4 - Células endoteliais circulantes e trombose venosa

O diagnóstico de trombofilia hereditária e adquirida somente é estabelecido em 70% dos pacientes com tromboembolismo venoso, fato que sugere a presença de mecanismos adicionais ainda desconhecidos na etiologia da doença (ANNICHINO-BIZZACCHI, 2004; ROSENDAAL *et al.*, 1995).

A identificação de fatores de risco para trombose é interessante, tanto em relação à orientação familiar quanto do próprio paciente, particularmente relacionada à conduta terapêutica (HEIJBOER *et al.*, 1990; POORT *et al.*, 1996; ROSENDAAL *et al.*, 1995; SILVERSTEIN *et al.*, 1998). Mais importante ainda na prática clínica é a identificação de fatores que possam ser utilizados para o acompanhamento e identificação de indivíduos com maior risco de um novo episódio trombótico.

Como citado anteriormente, as CECs foram detectadas em diversas condições associadas a injúria endotelial, e a expressão de fatores que participam da ativação da coagulação sangüínea também pode ter um papel na fisiopatologia da TVP.

As conseqüências fisiopatológicas de um aumento no número de CECs são incertas. Apesar de subpopulações de CECs expressarem E-selectina, indicando ativação celular, e ter sido descrita a expressão de fator tissular na anemia falciforme (SOLOVEY *et al.*, 1998), o quanto isso contribui direta ou indiretamente para um aumento do risco de trombose é desconhecido. Outro aspecto é que algumas dessas células são viáveis, e outras são apoptóticas ou necróticas, dependendo do quadro clínico do paciente.

Nos últimos 15 anos, o Setor de Hemostasia do Hemocentro tem avaliado todos os pacientes com diagnóstico de TVP encaminhados do Hospital das Clínicas da Unicamp,

e de toda macro-região de Campinas, investigando trombofilia hereditária e adquirida. Entretanto, verificou-se que 25% dos pacientes não apresentam nenhum fator de risco hereditário ou adquirido, sendo classificados como portadores de TVP espontânea (ANNICHINO-BIZZACCHI, 2004). Esses dados estimulam a descoberta de novos fatores de risco para TVP, dentro dessa linha de pesquisa.

1.5 - Modelo animal de trombose venosa

O emprego de modelo animal para o estudo da trombose venosa pode possibilitar a análise de parâmetros que não podem ser investigados em humanos, como a avaliação dos componentes do trombo venoso logo após a oclusão do vaso. Na literatura são descritos vários modelos animais de trombose venosa, utilizando camundongos, ratos, coelhos ou cães (SINGH *et al.*, 2002; DOWNING *et al.*, 1998; PETERSON & ZUCKER, 1970; WESSLER, 1962). A indução de trombose venosa por estase, mediante a ligadura da veia cava, já está bem padronizada na literatura, permitindo a realização de estudos experimentais (WAKEFIELD *et al.*, 1995; DOWNING *et al.*, 1998; HENKE *et al.*, 2000; WAKEFIELD *et al.*, 1999). Recentemente, Wang *et al.* (2006) descreveram um novo método de indução de trombose venosa em camundongos com a utilização de cloreto férrico (FeCl_3), que promove uma lesão endotelial e conseqüentemente a formação do trombo venoso.

2 - OBJETIVOS

Diante do exposto anteriormente são objetivos deste estudo:

1. Padronizar a identificação das CECs e CEPs no sangue periférico em humanos e camundongos pelo método de citometria de fluxo;
2. Identificar e quantificar as CECs e CEPs em pacientes com TVP ao diagnóstico, em pacientes com TVP crônica e, em um grupo controle;
3. Realizar uma análise prospectiva das CECs e CEPs nos pacientes após o episódio agudo de TVP;
4. Padronizar um modelo de TVP induzida por lesão endotelial em camundongos com o uso de FeCl_3 ;
5. Avaliar as CECs e CEPs no sangue periférico e no trombo venoso do modelo animal de TVP.

3 - CASUÍSTICA E MÉTODOS

3.1 – Casuística

3.1.1 - Pacientes com TVP ao diagnóstico (aguda) - 1ª coleta

Provenientes do Pronto Atendimento dos seguintes estabelecimentos: Hospital das Clínicas da UNICAMP, Hospital Municipal Dr. Mario Gatti de Campinas, Hospital Estadual Mario Covas de Sumaré, no período de Dezembro de 2007 a Maio de 2008.

3.1.1.1 - Critérios de inclusão

Confirmação do diagnóstico de TVP de membros inferiores, proximal e/ou distal, por ultrassom com doppler.

3.1.1.2 - Critérios de exclusão

Inicialmente foram excluídos pacientes com diagnóstico de câncer, doença renal ou hepática, cirurgia ou trauma, idade superior a 50 anos, uso de anticoncepcional hormonal ou terapia de reposição hormonal, uso de heparina ou warfarina, diabetes, antecedente pessoal de TVP, obesidade, hipertensão, presença de trombofilia, uso de medicamento.

Após 1 ano, no período de Dezembro de 2006 a Novembro de 2007, não foi possível a inclusão de nenhum paciente, pois todos avaliados apresentavam pelo menos um dos critérios de exclusão. Assim, alteramos esses critérios, permanecendo apenas: diagnóstico de câncer, doença renal ou hepática, cirurgia ou trauma (inferior a 6 meses), presença de anticorpos antifosfolipídios, idade superior a 60 anos e idade inferior a 18 anos.

3.1.2 - Pacientes com TVP (aguda), avaliação prospectiva - 2ª coleta

Os pacientes com TVP aguda analisados anteriormente foram recrutados para uma nova coleta, no período de Fevereiro de 2009 a Abril de 2009.

3.1.2.1 - Critérios de inclusão

Pacientes incluídos no grupo de TVP aguda, no mínimo após 6 meses da 1ª coleta.

3.1.2.2 - Critérios de exclusão

Foram excluídos pacientes com diagnóstico de câncer, doença renal ou hepática, cirurgia ou trauma (inferior a 6 meses), presença de anticorpos antifosfolipídios, idade superior a 60 anos e idade inferior a 18 anos.

3.1.3 - Pacientes com TVP crônica

Provenientes do Ambulatório de Hematologia do Hemocentro da UNICAMP, no período de Fevereiro de 2009 a Setembro de 2009.

3.1.3.1 - Critérios de inclusão

Confirmação do diagnóstico de TVP de membros inferiores, proximal e/ou distal, por ultrassom com doppler, até 3 anos após o diagnóstico.

3.1.3.2 - Critérios de exclusão

Foram excluídos pacientes com diagnóstico de câncer, doença renal ou hepática, cirurgia ou trauma (inferior a 6 meses), presença de anticorpos antifosfolipídios, idade superior a 60 anos e idade inferior a 18 anos.

3.1.4 – Controles

Voluntários provenientes do quadro funcional do Hemocentro da UNICAMP, no período de Janeiro de 2008 a Abril de 2010.

3.1.4.1 - Critérios de inclusão

Foram incluídos indivíduos saudáveis.

3.1.4.2 - Critério de exclusão

Foram excluídos controles com câncer, doença renal ou hepática, cirurgia ou trauma (inferior a 6 meses), presença de anticorpos antifosfolipídios, idade superior a 60 anos e idade inferior a 18 anos.

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP (Anexo1). Após a assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido e preenchimento do questionário (Anexos 1e 2), foi realizada a coleta de sangue.

3.2 - Coleta de sangue

Para todos os indivíduos foram coletados aproximadamente 10 mL de sangue, em 2 tubos *Vacutainer*, com EDTA a 10%. O primeiro tubo foi utilizado para realizar o hemograma (aparelho Cell Dyn) e extração de DNA; o segundo tubo foi exclusivo para a identificação e quantificação das CECs e CEPs.

3.3 – Quantificação das CECs e CEPs no sangue periférico de humanos

A quantificação das CECs e 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), alofocianina (APC):

- CD31 - FITC (clone MBC78.2; PECAM1.2, Invitrogen): marcador de células endoteliais, granulócitos, monócitos, plaquetas e algumas células T.

- CD34 - FITC (clone 8G12, Becton Dickinson): marcador de células progenitoras hematopoiéticas.
- CD45 - PerCP (clone 2D1, Becton Dickinson): marcador de leucócitos;
- CD133 - APC (clone AC133, Miltenyi Biotec): marcador de célula progenitora hematopoiética;
- CD144 - PE (clone TEA1/31, Beckman Coulter): marcador de células endoteliais;
- CD146 - PE (clone PIH12, Becton Dickinson): marcador de células endoteliais, de melanoma, de músculo liso, trofoblastos e subpopulação de células T ativadas;
- VEGFR2 - PE (clone 89106, R&D): marcador de células endoteliais, de células endoteliais progenitoras e monócitos;
- IgG1 – FITC; IgG1 – PE; IgG1 - PerCP; IgG1 - APC: Controles negativos.

Procedimento:

Para marcação das células utilizou-se uma concentração de $5,0-10,0 \times 10^3$ leucócitos/ μL na amostra de sangue total. Volumes de $100\mu\text{L}$ foram incubados por 20 minutos, à 4°C no escuro, com $5\mu\text{L}$ de cada anticorpo monoclonal, conforme um painel de 4 cores, descrito a seguir:

Tubo 1) IgG1 - FITC/ IgG1 - PE/ IgG1 - PerCP/ IgG1 - APC;

Tubo 2) CD31 - FITC/ CD144 - PE/ CD45 - PerCP/ CD133 - APC;

Tubo 3) CD31 - FITC/ CD146 - PE/ CD45 - PerCP/ CD133 - APC;

Tubo 4) CD31 - FITC/ VEGFR2 - PE/ CD45 - PerCP/ CD133 - APC;

Tubo 5) CD34 - FITC/ VEGFR2 - PE/ CD45 - PerCP/ CD133 - APC.

Após a incubação os eritrócitos foram lisados com 2mL de FACS *lysing* diluída 1:10 (Becton Dickinson), e incubados novamente por 10 minutos. As células

foram centrifugadas a 1500 rpm por 5 minutos, lavadas com PBS/BSA 2% (pH=7,4) e foi realizada a aquisição de 100.000 células (eventos) no citômetro de fluxo FACSCalibur (Becton Dickinson) através do *software Cell-Quest*. A análise dos dados foi realizada pelo *software Paint-a-Gate*.

A Tabela 1 mostra a definição das CECs e CEPs de acordo com os resultados obtidos no painel com diferentes anticorpos.

Tabela 1. Descrição das populações de CECs e CEPs em humanos de acordo com o painel de anticorpos utilizados.

Tubo	CECs	CEPs
1	Controle negativo	Controle negativo
2	CD31 ⁺ CD144 ⁺ CD45 ^{dim} CD133 ⁻	CD31 ⁺ CD144 ⁺ CD45 ^{dim} CD133 ⁺
3	CD31 ⁺ CD146 ⁺ CD45 ^{dim} CD133 ⁻	CD31 ⁺ CD146 ⁺ CD45 ^{dim} CD133 ⁺
4	CD31 ⁺ VEGFR2 ⁺ CD45 ^{dim} CD133 ⁻	CD31 ⁺ VEGFR2 ⁺ CD45 ^{dim} CD133 ⁺
5	Não utilizado para identificação de CEC	CD34 ⁺ VEGFR2 ⁺ CD45 ^{dim} CD133 ⁻
		CD34 ⁺ VEGFR2 ⁺ CD45 ^{dim} CD133 ⁺
		CD34 ⁻ VEGFR2 ⁺ CD45 ^{dim} CD133 ⁺

Estratégia de Análise das CECs e CEPs:

No gráfico ou *dot plot*, FSC (tamanho) x SSC (granulosidade) os debris localizados à esquerda (figura 1a) foram eliminados da análise (figura 1b), tomando-se o cuidado de manter a região de linfócitos.

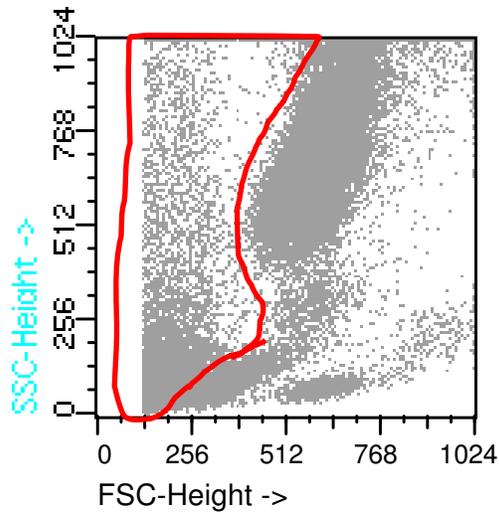


Figura 1a. Dot Plot FSC x SSC.

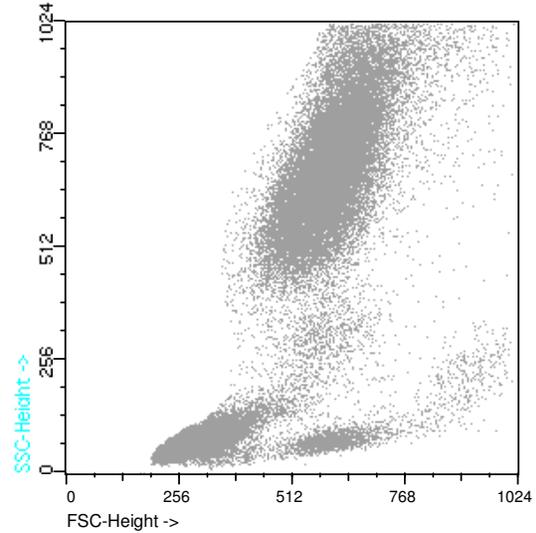


Figura 1b. Dot Plot FSC x SSC.

No gráfico CD45 (leucócitos) x SSC foram selecionadas as células CD45 negativas até um positivo fraco ($CD45^{dim}$) para a exclusão de leucócitos (Figura 1c). No gráfico CD31 (células endoteliais) x CD45 foram selecionadas as células CD31 positivas ($CD31^+$) (Figura 1d).

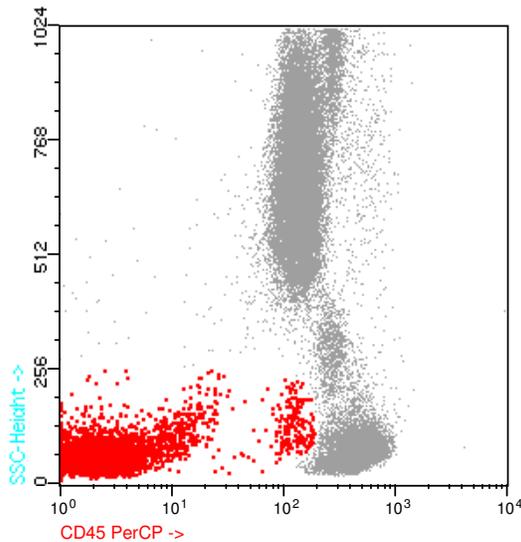


Figura 1c. Dot Plot CD45 x SSC.

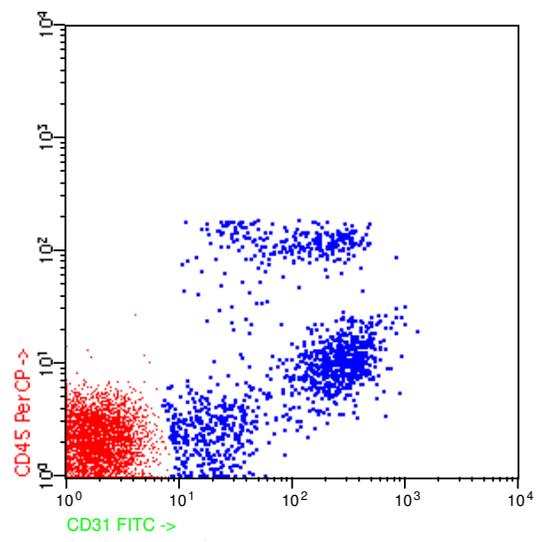


Figura 1d. Dot Plot CD31 x CD45.

No gráfico VEGFR2 (célula endotelial) x SSC foram selecionadas as células VEGFR2 positivas ($VEGFR2^+$) (figura 1e). No gráfico CD133 (células endoteliais progenitoras) x SSC foram selecionadas as células CD133 positivas ($CD133^+$) (Figura 1f).

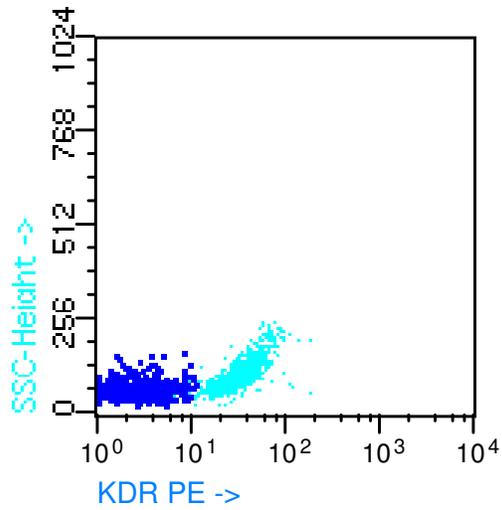


Figura 1e. Dot Plot VEGFR2 x SSC.

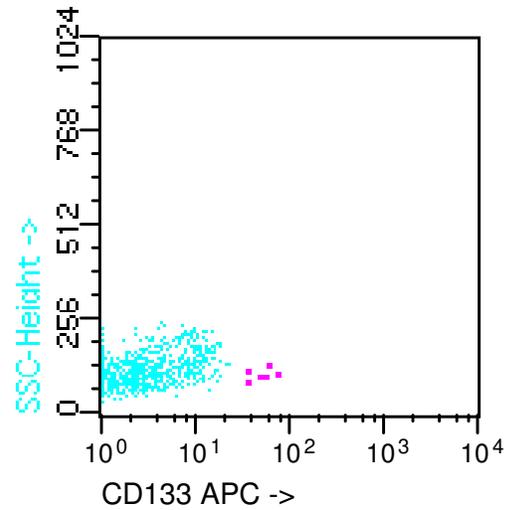


Figura 1f. Dot Plot CD133 x SSC.

Desta maneira, identificamos a porcentagem das CECs ($CD31^+ VEGFR2^+ CD45^{dim} CD133^-$) e CEPs ($CD31^+ VEGFR2^+ CD45^{dim} CD133^+$) (Figura 1g) no total de 100.000 eventos.

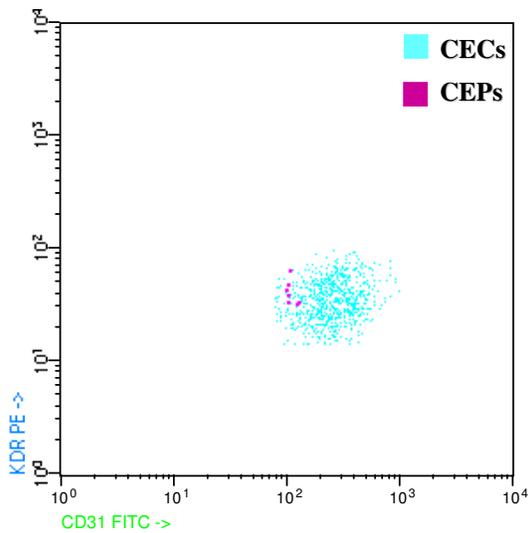


Figura 1g. Dot Plot CD31 x VEGFR2.

Cálculo das CECs e CEPs:

O cálculo das CECs e CEPs foi realizado pela fórmula descrita a seguir:

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

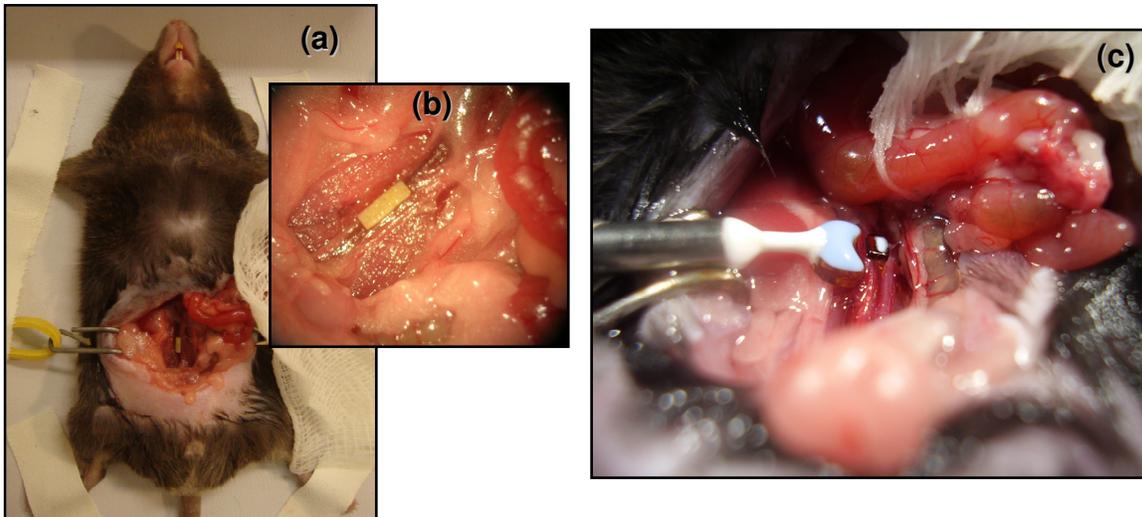
$$\text{CEP} = \frac{\% \text{ eventos} \times \text{n}^\circ \text{ leucócitos}/(\mu\text{L})}{100} = \text{n}^\circ \text{ CEP}/\mu\text{L}$$

Esse cálculo foi feito para as populações de CECs e CEPs obtidas para cada tubo descrito na tabela 1.

3.4- Modelo animal de TVP induzido por lesão endotelial com FeCl₃

Este experimento com modelo animal foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto de Biologia da UNICAMP (Anexo 4). Para os experimentos foram utilizados camundongos machos da linhagem C57Bl6 com 8 semanas e pesando entre 20 e 25g. Os animais foram anestesiados via intramuscular com ketamina (100mg/kg) e xilasina (20mg/kg), colocados em posição supina para a abertura da cavidade abdominal e exposição da veia cava inferior (VCI) (Figura 2a).

O processo de trombose venosa foi induzido através do uso de um papel filtro (3mmx1mm) pré-saturado com uma solução de FeCl₃ colocado durante 30 segundos sobre a VCI (Figura 2b). A formação do trombo venoso foi demonstrada com o auxílio de um ultra-som (modelo 0,5 PB, transonic systems, Ithaca, NY) que permite medir o fluxo sanguíneo (Figura 2c). Inicialmente, o fluxo da VCI foi de 0.40mL/minuto, após a indução da TVP observa-se a diminuição gradual até a ausência do fluxo. Através dessa análise foi padronizada a concentração de FeCl₃, de 15% e definido o tempo de oclusão de 8 a 10 minutos.



Figuras 2a-c. (a) Cavidade abdominal aberta e VCI isolada. (b) Papel filtro pré-saturado com solução FeCl_3 sobre a VCI. (c) Ultra-som colocado na VCI.

Após a indução da TVP foram coletadas amostras de sangue por punção cardíaca (Figura 3) e retirada a peça cirúrgica (trombo, VCI e aorta abdominal) nos tempos: 15 minutos; 30 minutos; 45 minutos; 1 hora; 24 horas; 48 horas e 72 horas. A análise das CECs e CEPs foi realizada pelo método de citometria de fluxo.

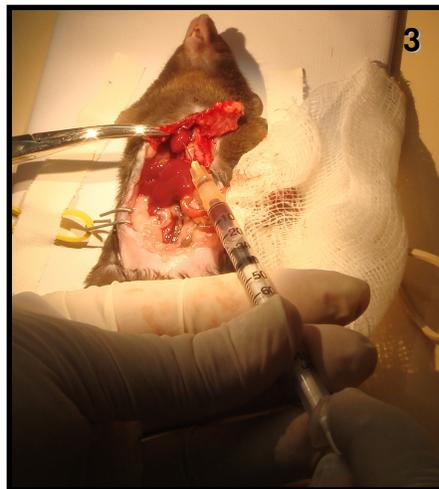


Figura 3. Coleta do sangue periférico do camundongo por punção cardíaca.

O trombo venoso, juntamente com a VCI e a aorta abdominal foram retirados e pesados. A peça cirúrgica foi emblocada em O.C.T. e cortada transversalmente em toda a sua extensão, sendo realizados cortes de 14µm a cada 140µm em aproximadamente 1,0mm. As lâminas foram armazenadas a -80°C.

O trombo venoso foi analisado pela coloração de Verhoff van Gienson e a identificação das CECs e CEPs pelo método de imunofluorescência.

3.5 - Avaliação do trombo venoso pela coloração de Verhoff van Gienson

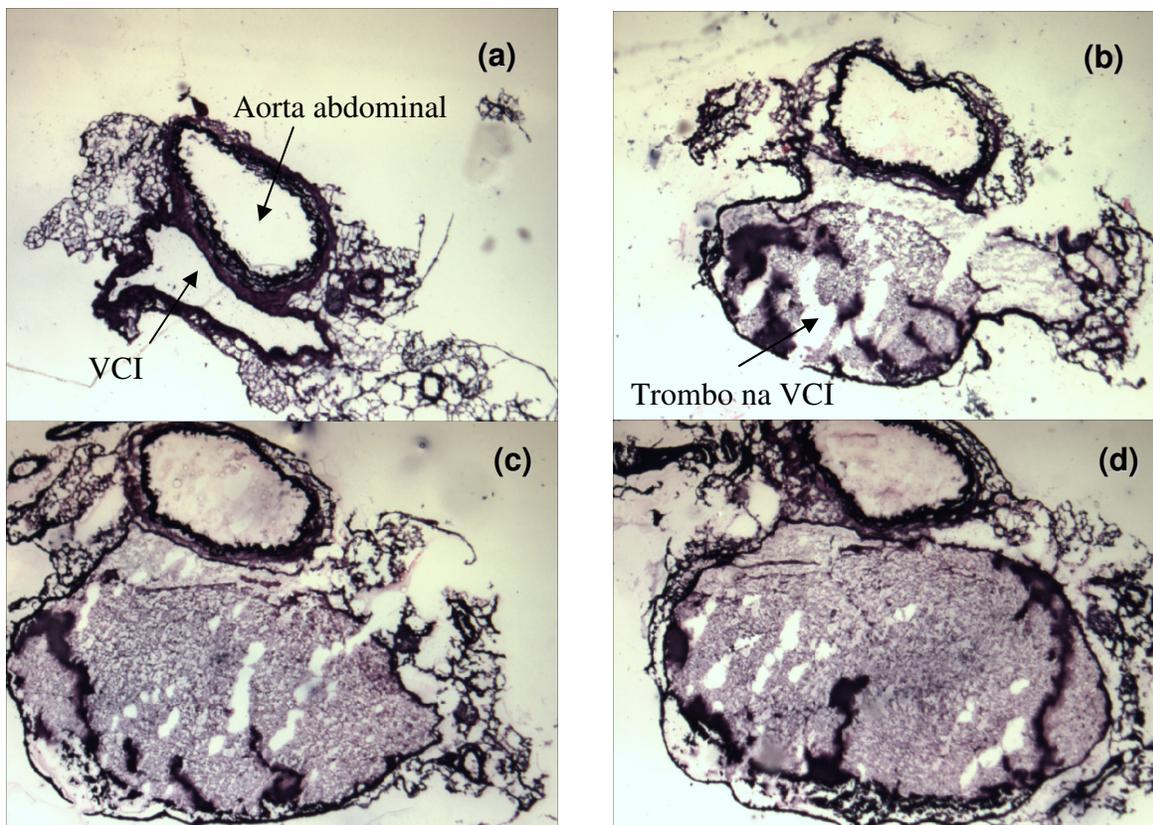
O trombo venoso foi analisado pela coloração de Verhoff van Gienson, que identifica especificamente a lâmina elástica e permite a visualização do limite do lúmen do vaso e a medida do tamanho do lúmen e de sua ocupação pelo trombo formado após a lesão venosa.

Procedimento:

As lâminas preparadas em O.C.T. foram secas à temperatura ambiente por 30 minutos e fixadas em acetona a 4°C por 20 minutos. Estas lâminas foram então colocadas em uma solução corante contendo hematoxilina 5%, FeCl₃ 29%, solução de Weigerts e água deionizada a 25°C por 10 minutos. Depois disso as lâminas foram colocadas em uma solução de FeCl₃ 2% para diferenciação, lavadas com etanol 95% e água, contra-coradas com solução de Van Gienson, desidratadas e montadas.

As Figuras 4 a-d mostram a análise histológica da formação do trombo venoso induzido pela lesão endotelial provocada pelo FeCl₃. Neste modelo o FeCl₃ promove inicialmente uma lesão agressiva a partir das camadas mais externas do vaso, começando da camada adventícia até a íntima. Após a lesão da íntima, ocorre ativação da coagulação e formação do trombo venoso.

A área do trombo venoso foi analisada através do *software* de imagem, SCION IMAGE Beta 4.0.2 (Scion Corporation, Frederick, MD, USA).



Figuras 4 a-d. (a) Ausência do trombo na VCI. (b) Início da formação do trombo na VCI. (c) Evolução do trombo formado na VCI. (d) Oclusão da VCI pelo trombo venoso

3.6- Quantificação das CECs e CEPs no sangue periférico de camundongos

A quantificação das CECs e CEPs no sangue periférico de camundongo foi realizada pelo método de citometria de fluxo, utilizando-se anticorpos monoclonais conjugados com os fluorocromos FITC, PE e PerCP:

- Sca1 – FITC: (clone D7, BD) marcador de células progenitoras hematopoiéticas;
- CD34 – FITC: (clone RAM34, eBioscience) marcador de células progenitoras hematopoiéticas;
- CD45 – PerCP: (clone 30-F11, BD) marcador leucocitário;
- VEGFR2 – PE: (clone AVAS 12 α 1, BD) marcador de células endoteliais e

linfócitos B e T;

- IgG1 - FITC; IgG1 - PE; IgG1 - PerCP: Controles negativos.

Procedimento:

Para marcação das células foram utilizados 100µL de sangue periférico incubados durante 20 minutos, a 4°C no escuro, com 1µL de cada anticorpo monoclonal, conforme um painel de 3 cores, descrito a seguir:

Tubo 1) IgG1 - FITC/ IgG1 - PE/ IgG1 - PerCP;

Tubo 2) Sca1 - FITC/ VEGFR2 - PE/ CD45 - PerCP;

Tubo 3) CD34 - FITC/ VEGFR2 - PE/ CD45 - PerCP.

Após a incubação os eritrócitos foram lisados com 2mL de FACS *lysing* diluída 1:10 (Becton Dickinson) e incubados novamente durante 10 minutos. As células foram centrifugadas a 1500rpm por 5 minutos, lavadas com PBS/BSA 2% (pH=7,4) e foi realizada a aquisição de 50.000 células (eventos) no citômetro de fluxo FACSCalibur (Becton Dickinson) através do *software* Cell-Quest (Becton Dickinson). A análise dos dados foi realizada pelo *software* Paint-a-gate (Becton Dickinson). Os resultados das populações de CECs, CEPs e células progenitoras foram expressos em porcentagem.

A Tabela 2 mostra a definição das CECs e CEPs de acordo com os resultados obtidos no painel com diferentes anticorpos.

Tabela 2. Descrição das populações de CECs e CEPs em camundongos de acordo com o painel de anticorpos utilizados.

Tubo	CECs	CEPs
2	Sca1 ⁻ VEGFR2 ⁺ CD45 ^{dim}	Sca1 ⁺ VEGFR2 ⁺ CD45 ^{dim}
3	CD34 ⁻ VEGFR2 ⁺ CD45 ^{dim}	CD34 ⁺ VEGFR2 ⁺ CD45 ^{dim}

Estratégia de Análise das CECs e CEPs:

A análise das CECs e CEPs em camundongos segue o mesmo raciocínio da análise em humanos, diferindo na utilização de um único marcador de célula endotelial, o VEGFR2 e no marcador de célula endotelial progenitora, o Sca1, que substitui o CD133.

A Figura 5 apresenta uma análise das CECs e CEPs em camundongos no total de 50.000 eventos adquiridos.

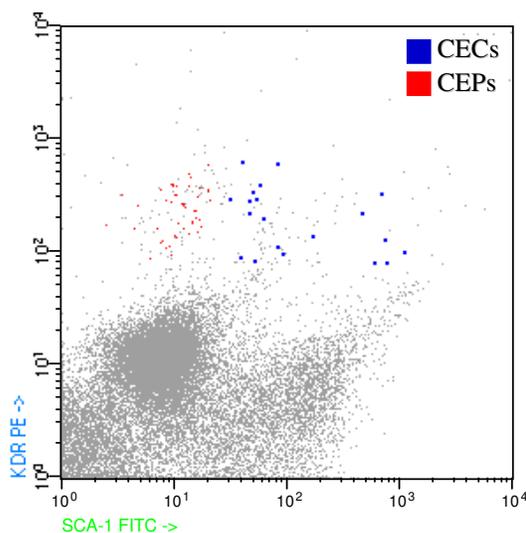


Figura 5. Dot Plot Sca1 x VEGFR2.

Cálculo das CECs e CEPs:

A análise das CECs e CEPs em camundongo é expressa pela porcentagem de células no total de 50.000 eventos adquiridos.

3.7 - Imunofluorescência para a Identificação das CECs e CEPs no trombo venoso

A presença das CECs e CEPs no trombo venoso foi analisada pelo método de imunofluorescência. Para a identificação de células endoteliais foi utilizado o anticorpo monoclonal CD31 (clone 390, Caltag) e para as células progenitoras os anticorpos CD34 (clone RAM34, Ebioscience) e Sca1 (clone D7, Becton Dickinson). Foram utilizados

anticorpos secundários anti-rat conjugado com os fluorocromos: FITC (cat. 81-9511, Invitrogen) e Cy5 (cat. 81-9516, Invitrogen).

Procedimento:

As lâminas foram retiradas do freezer (-80°C) e descongeladas durante 30 minutos em temperatura ambiente. Em seguida, foram fixadas com acetona a 4°C durante 20 minutos. Posteriormente, as lâminas foram lavadas durante 5 minutos com PBS.

O restabelecimento do antígeno foi feito através do citrato de sódio (pH=6) 10 mM durante 30 minutos em ebulição e 30 minutos a frio. Após 2 lavagens com PBS durante 5 minutos, as lâminas foram incubadas durante 20 minutos com uma solução bloqueadora (PBS/BSA 0,05%) e novamente lavadas 2 vezes durante 5 minutos em PBS. O anticorpo primário foi diluído em PBS/BSA 0,05% e incubados durante 1h a 37°C ou *overnight* a 4°C. Após 2 lavagens com PBS durante 5 minutos foi adicionado o anticorpo secundário correspondente diluído em PBS/BSA 0,05%, (diluído 100 vezes) e incubado durante 2h a temperatura ambiente. Novamente foram realizadas 2 lavagens com PBS durante 5 minutos e incubados com DAPI (0,5ug/ml, Sigma) durante 15 minutos a 37°C. Após lavagem com água destilada por 3 vezes, foi realizada a secagem e a montagem das lâminas.

3.8 - Análise estatística

A análise estatística foi realizada pelo *software* R Development Core Team (Vienna, Austria). Os testes de Fisher ou χ^2 foram utilizados para comparar variáveis categóricas entre os grupos estudados. Os testes de Kruskal-Wallis e Mann-Whitney foram utilizados para comparar as variáveis numéricas entre os grupos não pareados e o teste de Willcoxon para comparar as variáveis numéricas entre os grupos pareados. O resultado da análise estatística foi considerado estatisticamente significante com um valor de $P < 0,05$.

4 – RESULTADOS

4.1- Características clínicas

Neste trabalho foi realizada uma 1ª coleta de sangue de 9 pacientes com TVP ao diagnóstico (1 distal, 7 proximais e 1 proximal/distal; 7 do sexo feminino e 2 do sexo masculino), com idade mediana de 45 anos (26 a 54 anos), 5 Caucasóides e 4 Afro-descendentes. Os fatores de risco foram: uso de contraceptivo hormonal (n=2), antecedente pessoal de TVP (n=1), FV Leiden (n=1) e obesidade (n=1).

Após um período mediano de 11,5 meses (9 - 15 meses) foram recrutados para uma 2ª coleta 6 pacientes do grupo de TVP aguda (1 distal, 4 proximais e 1 proximal/distal; 5 do sexo feminino e 1 do sexo masculino), com idade mediana de 47,5 anos (27 a 55 anos), 4 Caucasóides e 2 Afro-descendentes. Como fatores de risco: uso de contraceptivo hormonal (n=1), antecedente pessoal de TVP (n=1), FV Leiden (n=1) e obesidade (n=1).

O grupo de TVP crônica foi composto por 10 pacientes (6 distais e 4 proximais; 6 do sexo feminino e 4 do sexo masculino), com idade mediana de 44,5 anos (29 a 56 anos), 6 Caucasóides, 2 Afro-descendentes, 1 Afro-Indígena e 1 Indígena. A mediana do tempo entre a TVP e a coleta foram 10,5 meses (4 – 36 meses). Os fatores de risco foram: uso de contraceptivo hormonal (n=2), antecedente pessoal de TVP (n=1) e FV Leiden (n=2).

O grupo controle foi composto por 11 indivíduos (9 do sexo feminino e 2 do sexo masculino), com idade mediana de 29 anos (21 a 52 anos), 7 Caucasóides, 1 Afro-descendente, 2 Afro-Indígenas e 1 Indígena. O único fator de risco presente foi o uso de contraceptivo hormonal (n=1). Os dados clínicos dos grupos de pacientes com TVP e controle estão resumidos na Tabela 3.

Tabela 3. Características clínicas dos grupos: TVP aguda 1ª coleta, TVP 2ª coleta, TVP crônica e Controle.

Grupos	Controle (n=11)	TVP 1ª coleta (n=9)	TVP 2ª coleta (n=6)	TVP crônica (n=10)	P*
Idade coleta, anos	29	45	47,5	44,5	NS
(mínimo – máximo)	(21 – 52)	(26 – 54)	(27 – 55)	(28 – 56)	0,018 (1ª coleta vs. 2ª coleta)
Idade TVP, anos	-	45	47	44	NS
(mínimo – máximo)		(26 – 54)	(26 – 54)	(26 – 56)	
Meses entre TVP e coleta	-	0,3	11,5	10,5	< 0,001
(mínimo – máximo)		(0 – 0,3)	(9 – 15)	(4 – 36)	< 0,001 (1ª coleta vs. 2ª coleta) < 0,001 (1ª coleta vs. crônica)
Antecedente familiar TVP	-	2 (22,2%)	2 (33,3%)	4 (40,0%)	NS
Sexo					
Feminino	9 (81,8%)	7 (77,8%)	5 (83,3%)	6 (60%)	NS
Masculino	2 (18,2%)	2 (22,2%)	1 (16,7%)	4 (40%)	
Origem étnica					
Caucasóide	7 (63,6%)	5 (55,6%)	4 (66,7%)	6 (60%)	NS
Afro/Indígena	4 (36,4%)	4 (44,4%)	2 (33,3%)	4 (40%)	
<u>Local da TVP no membro inferior:</u>					
Distal	-	1 (11,11%)	1 (16,7%)	6 (60%)	NS
Proximal	-	7 (77,8%)	4 (66,6%)	4 (40%)	
Distal/Proximal	-	1 (11,11%)	1 (16,7%)	0	
<u>Fatores de Risco associados à TVP:</u>					
Ausência	10 (91%)	4 (33,3%)	2 (33,3%)	5 (50%)	NS
Contraceptivo Hormonal	1 (9%)	2 (33,3%)	1 (16,7%)	2 (20%)	
Antecedente Pessoal TVP	0	1 (11,1%)	1 (16,7%)	1 (10%)	
FV Leiden	0	1 (11,1%)	1 (16,7%)	2 (10%)	
Obesidade	0	1 (11,1%)	1 (16,7%)	0	

* Teste de Kruskal-Wallis; Teste de Mann-Whitney; Teste de Wilcoxon; Teste de Fisher. Teste de χ^2 . NS: não significativo.

Quando comparamos a idade entre os grupos: controle, TVP aguda (1ª coleta), TVP aguda (2ª coleta) e TVP crônica, nenhuma diferença estatística foi observada. Porém, quando comparamos a idade no grupo de TVP aguda 1ª coleta com a 2ª coleta observou-se uma diferença estatisticamente significativa, com um $P=0,018$.

Conforme esperado, os pacientes do grupo de TVP aguda 1ª coleta apresentaram um tempo significativamente menor entre a TVP e a realização da coleta em relação aos outros grupos ($P<0,001$). Não houve diferença significativa no tempo entre os grupos: TVP 2ª coleta e TVP crônica.

Não houve diferença estatística quando comparamos o número de indivíduos do sexo masculino ou feminino nos grupos analisados. Contudo, o número de mulheres foi maior em todos os grupos analisados.

A distribuição da origem étnica entre os grupos não mostrou diferença significativa.

O local da TVP no membro inferior não mostrou diferença significativa entre os grupos.

A heterozigose para o FV de Leiden foi detectada em um paciente do grupo TVP aguda 1ª coleta, e em 2 pacientes do grupo TVP crônica, com uma prevalência de 15,78%. A mutação G20210A no gene da protrombina não foi observada em nenhum indivíduo dos grupos analisados.

Quando comparamos a presença de antecedente familiar de TVP entre os grupos de pacientes com TVP, não houve diferença significativa.

Os fatores de risco associados à TVP identificados nos pacientes e controles não mostrou uma diferença estatisticamente significativa.

A Tabela 4 mostra os fatores de risco pessoal e familiar para doença arterial. Os antecedentes familiares somente foram considerados em parentes até 3ª geração, com idade inferior a 50 anos. Como pode ser observado, não houve diferença entre a presença desses fatores nos grupos analisados.

Tabela 4. Fatores de risco pessoal e familiar para doença arterial nos grupos: controle, TVP aguda 1ª coleta, TVP aguda 2ª coleta e TVP crônica.

Fatores de Risco	Controle	TVP aguda 1ª coleta	TVP aguda 2ª coleta	TVP crônica	P*
Hipertensão	-	3 (33,3%)	2 (33,3%)	3 (30%)	NS
Diabetes	-	2 (22,2%)	1 (16,7%)	0	
IAM	-	0	0	1 (10%)	
Antecedente familiar de IAM	-	0	0	1 (10%)	
Antecedente familiar de AVCi	-	0	0	1 (10%)	

* Teste de Fisher. Teste de χ^2 . NS: não significativo.

4.2- Hemograma

A Tabela 5 mostra os resultados da mediana, mínimo e máximo da hemoglobina, hematócrito, leucócitos, granulócitos, linfócitos, monócitos e plaquetas nos grupos estudados.

Tabela 5. Resultado do hemograma dos grupos: controle, TVP aguda 1ª coleta, TVP aguda 2ª coleta e TVP crônica.

Hemograma	Controle	TVP aguda 1ª coleta	TVP aguda 2ª coleta	TVP crônica	P*
Hemoglobina (g/dL)	13.6 (12.7 – 15.9)	11.1 (9.7 – 14.0)	13.55 (8.20 – 15.90)	14.0 (8.4 – 15.7)	NS 0,03 (1ª coleta vs. controle) 0,03 (1ª coleta vs. crônica)
Hematócrito (%)	40.9 (34.5 – 46.2)	37.1 (31.5 – 43.3)	39.8 (25.4 – 46.9)	43.55 (29.7 – 47.9)	NS 0,04 (controle vs. 1ª coleta) 0,01 (1ª coleta vs. crônica)
Leucócitos (nº total/ μ L)	7100 (4200 – 8400)	9100 (7090 – 9040)	6585 (4700 – 5500)	7350 (4100 – 5700)	0,009 <0,001 (1ª coleta vs. controle) 0,01 (1ª coleta vs. 2ª coleta) 0,01 (1ª coleta vs. crônica)
Granulócitos (nº total/ μ L)	4000 (1500 – 5700)	5600 (1100 – 9040)	4685 (2000 – 5500)	4330 (2000 – 5700)	0,03 0,007 (controle vs. 1ª coleta) 0,009 (1ª coleta vs. crônica)
Linfócitos (nº total/ μ L)	2300 (1500 – 2800)	1960 (1470 – 2800)	2110 (970 – 2550)	2585 (1600 – 3400)	NS 0,05 (1ª coleta vs. crônica) 0,03 (2ª coleta vs. crônica)
Monócitos (nº total/ μ L)	470 (300 – 1100)	600 (310 – 800)	365 (300 – 1200)	300 (100 – 900)	NS 0,02 (1ª coleta vs. crônica)
Plaquetas (nº total/ μ L)	252000 (203000 – 362000)	317000 (221000 – 423000)	301000 (216000 – 411000)	301500 (267000 – 452000)	NS 0,03 (controle vs. crônica)

* Teste de Kruskal-Wallis; Teste de Mann-Whitney; Teste de Wilcoxon. NS: não significativo.

A mediana da concentração de hemoglobina mostrou-se menor no grupo de TVP aguda 1ª coleta quando comparado com o controle e TVP crônica (P=0,03). A mediana do hematócrito apresentou uma menor porcentagem no grupo de TVP aguda 1ª coleta quando comparado com o controle e TVP crônica (P=0,04; P=0,01; respectivamente).

O número de leucócitos estava elevado no grupo de TVP aguda 1ª coleta quando comparado ao controle, TVP 2ª coleta e TVP crônica ($P < 0,001$; $P = 0,01$; $P = 0,01$; respectivamente).

O número de granulócitos apresentou um aumento significativo no grupo de TVP aguda 1ª coleta quando comparado com o controle e TVP crônica ($P = 0,007$; $P = 0,009$; respectivamente).

Houve um aumento significativo no número de linfócitos do grupo de TVP crônica em relação aos grupos de TVP aguda 1ª coleta e TVP aguda 2ª coleta ($P = 0,05$; $P = 0,03$; respectivamente).

O número de monócitos no grupo de TVP aguda 1ª coleta mostrou-se aumentado quando comparado com o grupo de TVP crônica ($P = 0,02$).

O número de plaquetas mostrou-se elevado no grupo de TVP crônica quando comparado com o controle ($P = 0,03$).

4.3- Análises das CECs no sangue periférico de humanos

A Tabela 6 mostra a mediana, mínima e máxima dos números das CECs de acordo com o painel de anticorpos monoclonais empregados.

Tabela 6. Número das CEC/ μ L nos grupos: controle, TVP aguda 1^a coleta, TVP aguda 2^a coleta e TVP crônica.

Tubo	População de CEC/ μ L	CT	TVP aguda 1 ^a coleta	TVP aguda 2 ^a coleta	TVP crônica	P*
2	CD31 ⁺ CD144 ⁺ CD45 ^{dim} CD133 ⁻	0,1 (0 – 0,3)	5,2 (0,1 – 45,0)	0,3 (0,1 – 0,6)	0,1 (0 – 0,4)	0,001 <0,001 (CT vs. 1 ^a coleta) 0,009 (CT vs. 2 ^a coleta) 0,002 (1 ^a coleta vs. crônica) 0,03 (2 ^a coleta vs. crônica)
3	CD31 ⁺ CD146 ⁺ CD45 ^{dim} CD133 ⁻	0,1 (0 – 0,26)	5,0 (0,3 – 45,0)	0,4 (0 – 0,7)	0,2 (0,1 – 0,5)	< 0,001 <0,001 (CT vs. 1 ^a coleta) 0,03 (CT vs. 2 ^a coleta) 0,04 (CT vs. crônica) 0,03 (1 ^a coleta vs. 2 ^a coleta) <0,001 (1 ^a coleta vs. crônica)
4	CD31 ⁺ VEGFR2 ⁺ CD45 ^{dim} CD133 ⁻	0,16 (0 – 0,34)	5,4 (0,2 – 46,0)	0,2 (0 – 0,5)	0,15 (0 – 0,5)	0,002 <0,001 (CT vs. 1 ^a coleta) 0,016 (1 ^a coleta vs. 2 ^a coleta) 0,001 (1 ^a coleta vs. crônica)

* Teste de Kruskal-Wallis; Teste de Mann-Whitney; Teste de Wilcoxon.

Observou-se uma diferença estatisticamente significativa no número das CECs quantificadas pelo tubo 2 (CD31⁺ CD144⁺ CD45^{dim} CD133⁻) entre os grupos (P=0,001).

O número das CECs foi significativamente maior no grupo de TVP aguda 1^a coleta quando comparado com os grupos: controle e TVP crônica (P<0,001; P=0,002; respectivamente).

O número das CECs mostrou-se maior no grupo de TVP 2^a coleta quando comparado com o controle e TVP crônica (P=0,009; P=0,03; respectivamente) (Figura 6).

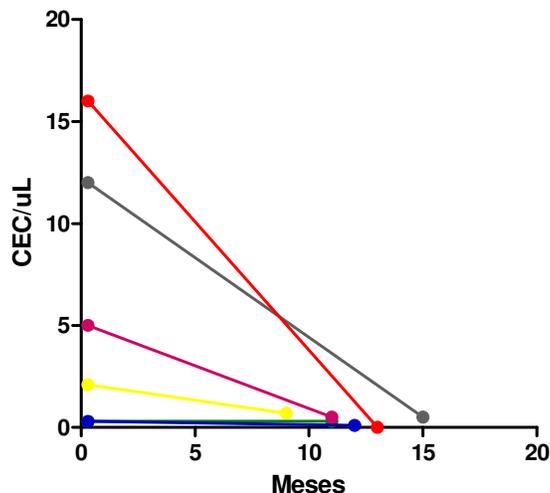


Figura 9. Representação gráfica do número das CECs ($CD31^+ CD146^+ CD45^{dim} CD133^-$) de cada indivíduo do grupo de TVP aguda na 1ª coleta e na 2ª coleta.

O número das CECs definido conforme o painel do tubo 4 ($CD31^+ VEGFR2^+ CD45^{dim} CD133^-$) apresentou diferença estatística entre os grupos analisados ($P=0,002$). O número das CECs apresentou um aumento significativo no grupo de TVP aguda 1ª coleta quando comparado com o controle, TVP aguda 2ª coleta e TVP crônica ($P<0,001$; $P=0,01$; $P=0,001$, respectivamente) (Figura 10 e 11).

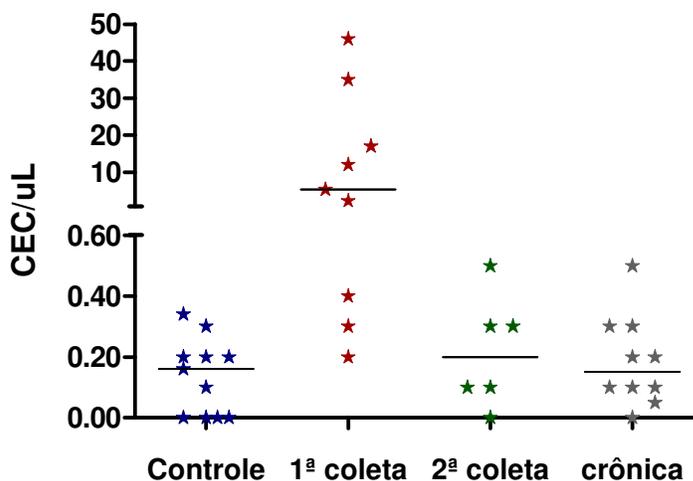


Figura 10. Representação gráfica do número de CECs ($CD31^+ VEGFR2^+ CD45^{dim} CD133^-$) de cada indivíduo e mediana em cada um dos grupos estudados.

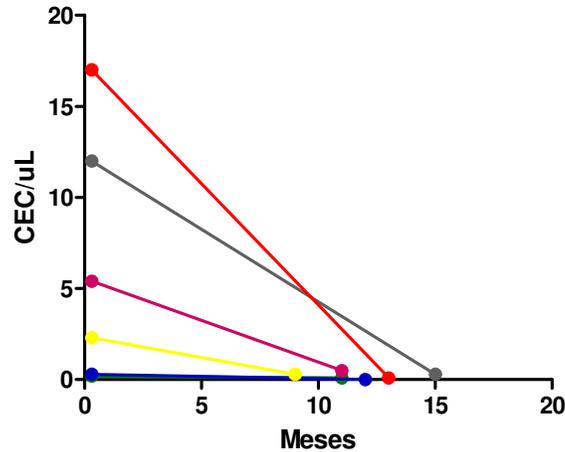


Figura 11. Representação gráfica do número das CECs (CD31⁺ VEGFR2⁺ CD45^{dim} CD133⁻) de cada indivíduo do grupo de TVP aguda na 1^a coleta e na 2^a coleta.

4.4- Análises das CEPs no sangue periférico de humanos

A tabela 7 apresenta os resultados da mediana, mínimo e máximo das CEPs de acordo com o painel de anticorpos monoclonais empregados nos grupos estudados.

Tabela 7. Número das CEP/ μ L nos grupos: controle, TVP aguda 1^a coleta, TVP aguda 2^a coleta e TVP crônica.

	População de CEP/ μ L	CT	TVP 1 ^a coleta	TVP 2 ^a coleta	TVP crônica	P*
Tubo 2	CD31 ⁺ CD144 ⁺ CD45 ^{dim} CD133 ⁺	0	0	0	0	-
Tubo 3	CD31 ⁺ CD146 ⁺ CD45 ^{dim} CD133 ⁺	0	0 (0 – 0,1)	0	0	NS
Tubo 4	CD31 ⁺ VEGFR2 ⁺ CD45 ^{dim} CD133 ⁺	0	0	0	0	-
Tubo 5	CD34 ⁻ VEGFR2 ⁺ CD45 ^{dim} CD133 ⁺	0 (0 – 0,1)	0	0	0	NS
	CD34 ⁺ VEGFR2 ⁺ CD45 ^{dim} CD133 ⁻	0 (0 – 0,1)	0,05 (0 – 1,9)	0 (0 – 0,1)	0 (0 – 0,1)	NS
	CD34 ⁺ VEGFR2 ⁺ CD45 ^{dim} CD133 ⁺	0	0	0	0	-

* Teste de Kruskal-Wallis; Teste de Mann-Whitney; Teste de Wilcoxon. NS: não significativo.

A análise das CEPs no tubo 5 (VEGFR2⁺ CD34⁺ CD45^{dim} CD133⁺), (VEGFR2⁺ CD34⁻ CD45^{dim} CD133⁺) e (VEGFR2⁺ CD34⁺ CD45^{dim} CD133⁻), não mostrou diferença significativa entre os grupos.

O grupo de TVP aguda 1^a coleta apresentou um aumento das CEPs (VEGFR2⁺ CD34⁺ CD45^{dim} CD133⁻) mas sem diferença estatística (Figura 12).

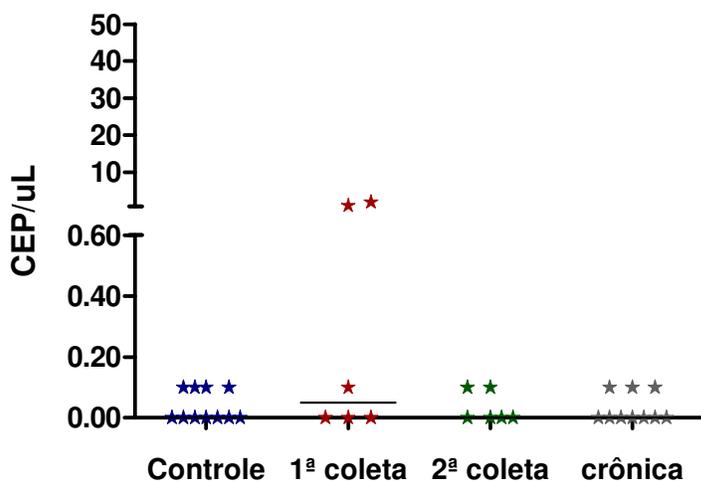


Figura 12. Representação gráfica do número das CEPs (CD34⁺ VEGFR2⁺ CD45^{dim} CD133⁻) de cada indivíduo e mediana em cada um dos grupos estudados.

Como 5 (55,6%) pacientes do grupo TVP aguda 1^a coleta e 4 pacientes (66,7%) do grupo TVP aguda 2^a coleta estavam utilizando heparina e warfarina, respectivamente, analisamos se estes poderiam interferir com o número de células encontradas. Os nossos resultados mostraram que não houve diferença nos resultados obtidos com ou sem o uso desses anticoagulantes.

4.5- Modelo Animal

4.5.1- Peso da peça cirúrgica

O grupo controle foi realizado para avaliar o nível basal das CECs e CEPs sem qualquer estímulo. O trombo foi pesado juntamente com a VCI e a aorta abdominal e no caso do grupo controle, o mesmo não foi formado. A Tabela 8 mostra os resultados da mediana, mínimo e máximo do peso do material retirado (peça cirúrgica) (g).

Tabela 8. Peso da peça cirúrgica (g) nos intervalos de tempo estudados.

Grupos	n	Peso (g)	P*
Controle	7	0,0041 (0,0037 – 0,0053)	
15 minutos	6	0,0068 (0,0057 – 0,0090)	0,002 (15' vs. CT)
30 minutos	5	0,0075 (0,0064 – 0,0096)	0,003 (30' vs. CT)
45 minutos	5	0,0074 (0,0068 – 0,0087)	0,003 (45' vs. CT)
1 hora	6	0,0090 (0,0047 – 0,0155)	0,006 (1h vs. CT)
24 horas	5	0,0101 (0,0065 – 0,0112)	0,003 (24h vs. CT)
48 horas	8	0,0099 (0,0053 – 0,0140)	0,001 (48h vs. CT); 0,041 (48h vs. 15')
72 horas	6	0,0100 (0,0050 – 0,0125)	0,004 (72h vs. CT); 0,046 (72h vs. 15')

P* Teste de Mann-Whitney.

A mediana do peso da peça cirúrgica no grupo controle foi significativamente menor em relação a todos os outros tempos analisados: 15', 30', 45', 1h, 24h, 48h e 72h (P=0,002; P=0,003; P=0,003; P=0,006; P=0,003; P=0,001; P=0,004; respectivamente). A mediana do peso da peça cirúrgica foi menor aos 15 minutos após a indução da TVP quando comparada com a mediana do peso em 48 e 72 horas (P=0,041; P=0,046; respectivamente) (Figura 13).

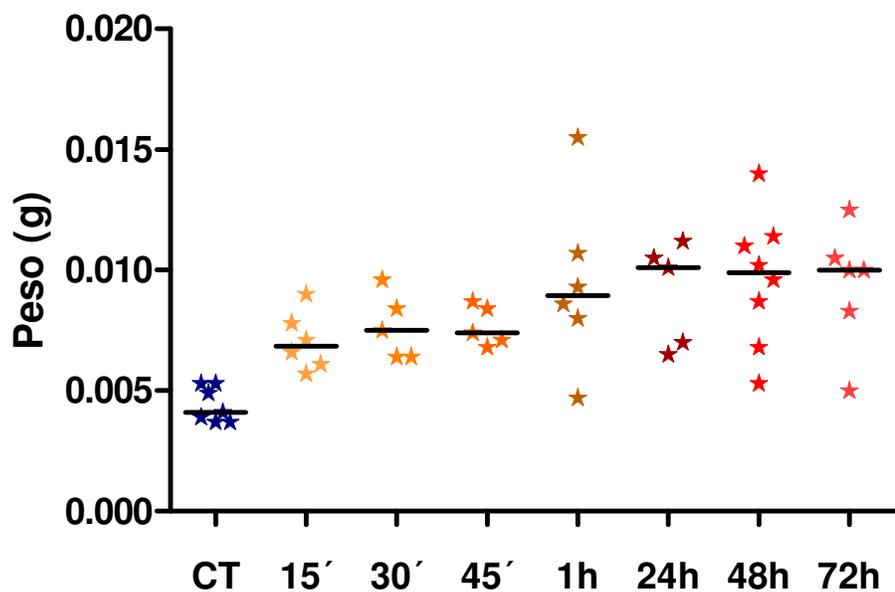
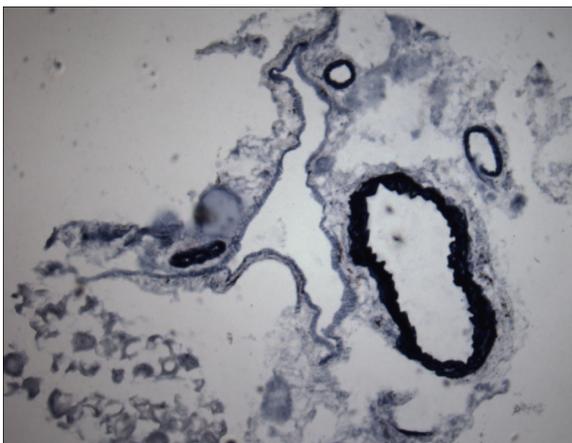


Figura 13. Representação gráfica do peso da peça cirúrgica (g) de cada camundongo, média e desvio padrão nos grupos estudados.

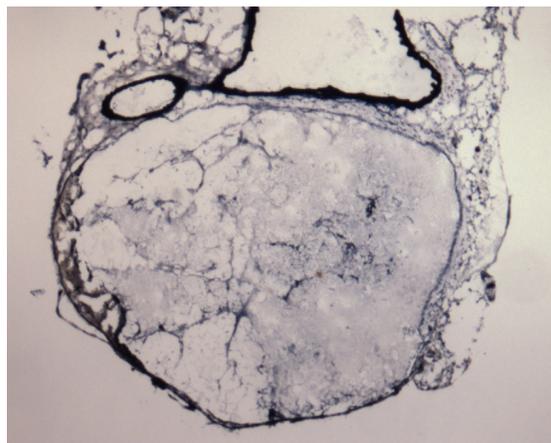
4.5.2- Avaliação do trombo venoso

Através da coloração Verhoff van Gienson foi possível observar o trombo venoso formado em todos os intervalos de tempo estudados (Figuras 14 a-h).

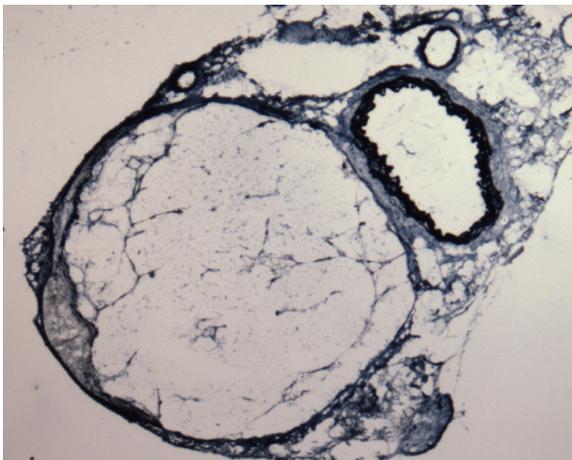
(a). Controle



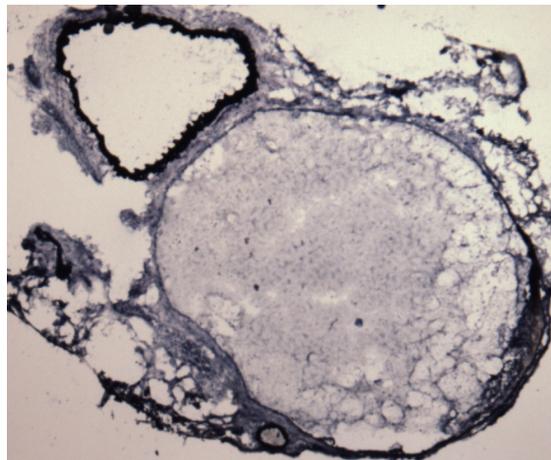
(b). 15 minutos



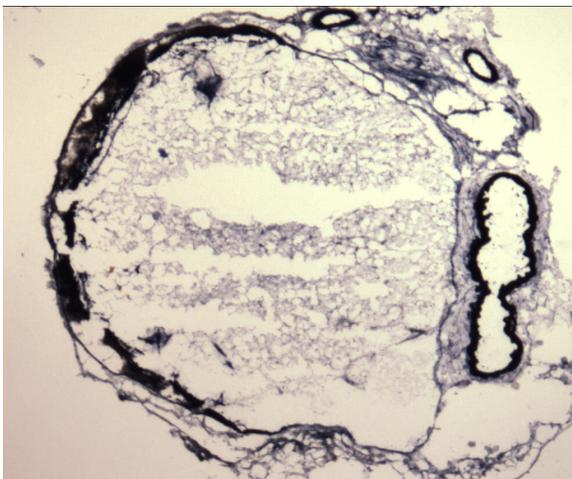
(c). 30 minutos



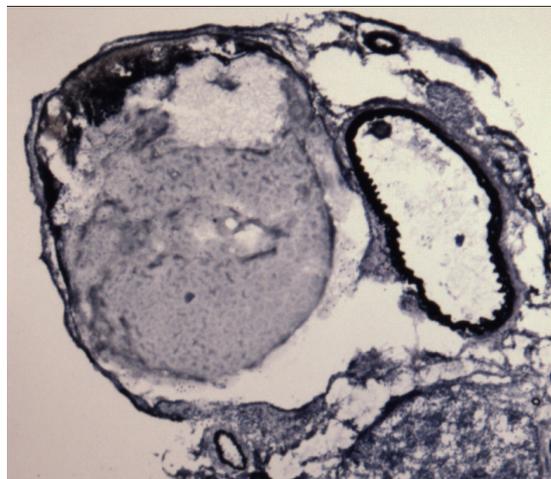
(d). 45 minutos



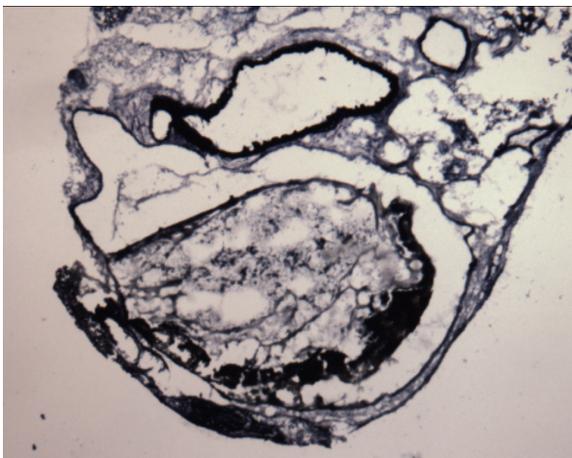
(e). 1 hora



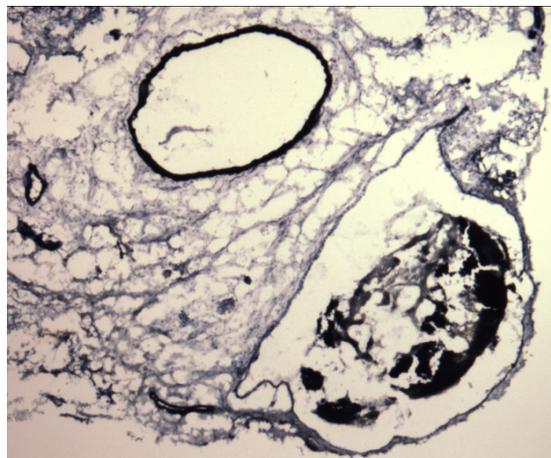
(f). 24 horas



(g). 48 horas



(h). 72 horas



Figuras 14 a-h. Visualização do trombo venoso pela coloração de Verhoff van Gienson nos tempos avaliados. (a) controle; (b). 15 minutos; (c) 30 minutos; (d) 45 minutos; (e) 1 hora; (f) 24 horas; (g) 48 horas e (h) 72 horas.

Conforme esperado, o grupo controle não apresentou trombo na VCI. O modelo animal de TVP apresentou trombo na VCI em todos os intervalos de tempo estudados, uma vez que a oclusão do vaso ocorre entre 8 a 10 minutos.

O trombo formado nos tempos entre 15 minutos e 1 hora promoveu uma oclusão total da VCI. A partir desse tempo, a VCI apresenta uma oclusão parcial que foi regredindo de 85,4% em 24h para 65,3% em 48h e 51,1% em 72h.

4.6 - Análise das CECs no sangue periférico de camundongo

A Tabela 9 mostra a porcentagem das CECs no sangue periférico nos intervalos de tempo estudados.

Tabela 9. Porcentagem das CECs nos intervalos de tempo avaliados.

Grupos	Sca1 ⁻ VEGFR2 ⁺ CD45 ^{dim} (%)	P*	CD34 ⁺ VEGFR2 ⁺ CD45 ^{dim} (%)	P*
CT	0,004 (0,002 – 0,02)	0,024 (CT vs. 24h) 0,001 (CT vs. 48h)	0,006 (0 – 0,01)	0,001 (CT vs. 48h)
15´	0,004 (0 – 0,006)	0,005 (15´ vs. 24h) 0,001 (15´ vs. 48h)	0,003 (0 – 0,04)	0,004 (15´ vs. 48h)
30´	0,004 (0 – 0,008)	0,013 (30´ vs. 24h) 0,002 (30´ vs. 48h)	0,003 (0 – 0,008)	0,002 (30´ vs. 48h)
45´	0,004 (0,002 – 0,02)	0,004 (45´ vs. 48h)	0 (0 – 0,01)	0,003 (45´ vs. 48h)
1h	0,006 (0,002 – 0,01)	0,002 (1h vs. 48h)	0,006 (0 – 0,02)	0,003 (1h vs. 48h)
24h	0,01 (0,006 – 0,03)	0,009 (24h vs. 48h)	0,004 (0 – 0,01)	0,003 (24h vs. 48h)
48h	0,115 (0,01 – 0,87)	0,007 (48h vs. 72h)	0,12 (0,01 – 0,58)	0,014 (48h vs. 72h)
72h	0,007 (0 – 0,04)	0,01 (72h vs. 15´)	0,007 (0 – 0,05)	

P* Teste de Mann-Whitney.

A porcentagem das CECs (Sca1⁻ VEGFR2⁺ CD45^{dim}) apresentou um aumento estatisticamente significativo em 24 horas quando comparado com os grupos: CT, 15´, e 30´ (P=0,024; P=0,005; P=0,013; respectivamente). Em 48 horas a porcentagem das CECs foi maior quando comparado com todos os grupos: CT, 15´, 30´, 45´, 1h, 24h e 72h

(P=0,001; P=0,001; P=0,002; P=0,004; P=0,002; P=0,009; P=0,007; respectivamente)
(Figura 15).

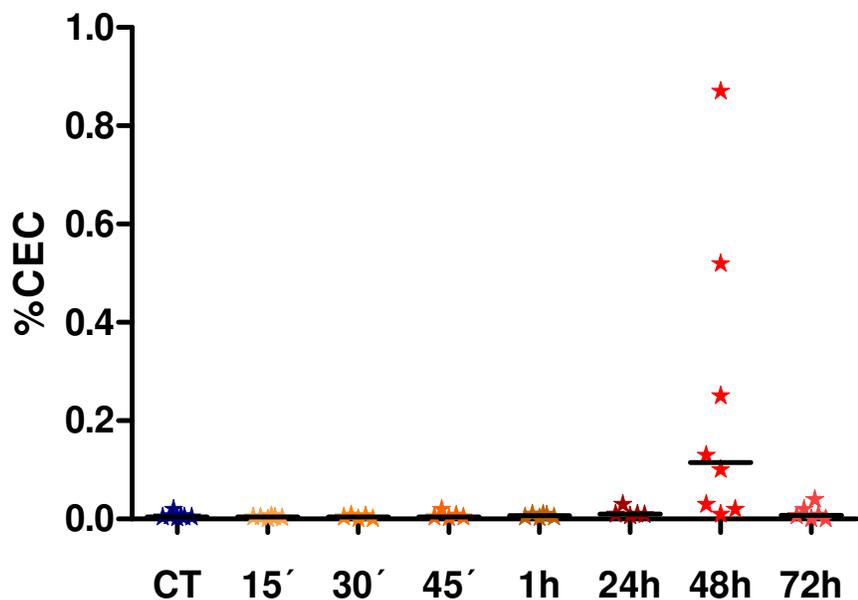


Figura 15. Representação gráfica da porcentagem das CECs ($Sca1^- VEGFR2^+ CD45^{dim}$) de cada camundongo e mediana nos grupos estudados.

A porcentagem das CECs ($CD34^- VEGFR2^+ CD45^{dim}$) apresentou um aumento estatístico no grupo de 48 horas após a indução da TVP quando comparado com todos os grupos estudados: CT, 15', 30', 45', 1h, 24h e 72h (P=0,001; P=0,004; P=0,002; P=0,003; P=0,003; P=0,003; P=0,014; respectivamente) (Figura 16).

Tabela 10. Porcentagem das CEPs nos intervalos de tempo avaliados.

Grupos	Sca1 ⁺ VEGFR2 ⁺ CD45 ^{dim} (%)	P*	CD34 ⁺ VEGFR2 ⁺ CD45 ^{dim} (%)	P*
CT	0,008	0,004 (CT vs. 24h)	0,006	0,013 (CT vs. 24h)
	(0,001 – 0,02)	0,016 (CT vs. 48h)	(0 – 0,01)	0,015 (CT vs. 48h)
		0,01 (CT vs. 72h)		0,03 (CT vs. 72h)
15´	0,001	0,004 (15´ vs. 24h)	0,003	0,004 (15´ vs. 24h)
	(0 – 0,006)	0,007 (15´ vs. 48h)	(0 – 0,04)	0,005 (15´ vs. 48h)
		0,002 (15´ vs. 72h)		0,03 (15´ vs. CT)
		0,013 (15´ vs. CT)		0,002 (15´ vs. 72h)
30´	0,01	0,004 (30´ vs. 24h)	0,003	0,018 (30´ vs. 24h)
	(0 – 0,015)	0,033 (30´ vs. 48h)	(0 – 0,008)	0,017 (30´ vs. 48h)
		0,04 (30´ vs. 72h)		0,014 (30´ vs. 72h)
45´	0,002	0,006 (45´ vs. 24h)	0	0,006 (45´ vs. 24h)
	(0 – 0,004)	0,011 (45´ vs. 48h)	(0 – 0,01)	0,008 (45´ vs. 48h)
		0,004 (45´ vs. 72h)		0,004 (45´ vs. 72h)
		0,014 (45´ vs. CT)		
1h	0,004	0,005 (1h vs. 24h)	0,006	0,032 (1h vs. 24h)
	(0 – 0,02)	0,014 (1h vs. 48h)	(0 – 0,02)	0,016 (1h vs. 48h)
		0,008 (1h vs. 72h)		0,021 (1h vs. 72h)
24h	0,04		0,004	
	(0,02 – 0,06)		(0 – 0,01)	
48h	0,04		0,12	
	(0 – 0,22)		(0,01 – 0,58)	
72h	0,025		0,007	
	(0,01 – 0,05)		(0 – 0,05)	

P* Teste de Mann-Whitney.

A porcentagem das CEPs (Sca1⁺ VEGFR2⁺ CD45^{dim}) apresentou um aumento no grupo de 24 horas quando comparado com os grupos: CT, 15´, 30´, 45´ e 1h (P=0,004; P=0,004; P=0,004; P=0,006; P=0,005; respectivamente).

O grupo de 48 horas apresentou uma maior porcentagem das CEPs quando comparado com os grupos: CT, 15´, 30´, 45´ e 1h (P=0,016; P=0,007; P=0,033; P=0,011; P=0,014; respectivamente).

A porcentagem das CEPs no grupo de 72 horas apresentou-se aumentada em relação aos grupos: CT, 15´, 30´, 45´, e 1h (P=0,01; P=0,002; P=0,04; P=0,004; P=0,008; respectivamente).

Os grupos de 15 minutos e 45 minutos após a indução da TVP mostraram uma porcentagem menor em relação ao controle (P=0,013; P=0,014; respectivamente) (Figura 17).

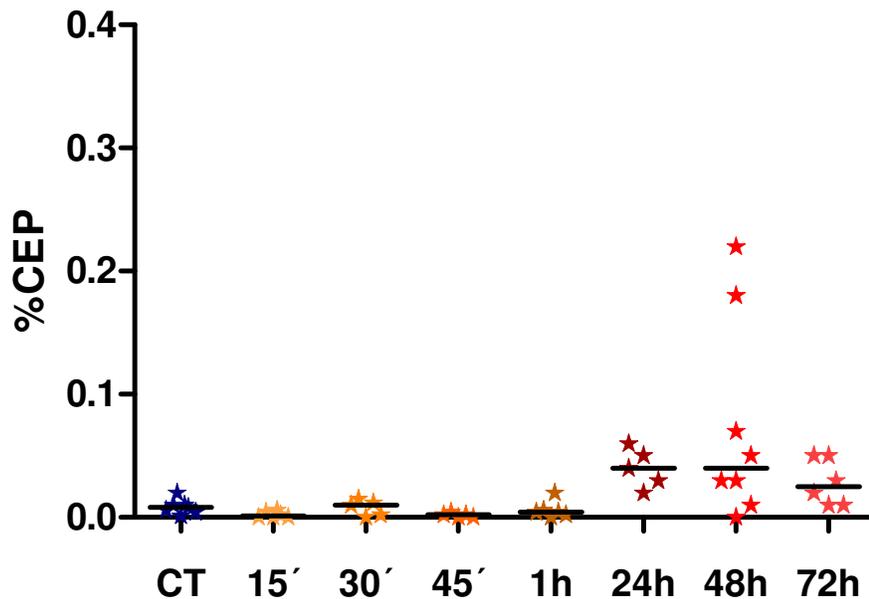


Figura 17. Representação gráfica da porcentagem das CEPs ($Sca1^+ VEGFR2^+ CD45^{dim}$) de cada camundongo e mediana nos grupos estudados.

A porcentagem das CEPs ($CD34^+ VEGFR2^+ CD45^{dim}$) apresentou um aumento significativo no grupo de 24 horas em relação aos tempos anteriores: CT, 15', 30', 45', e 1h (P=0,013; P=0,004; P=0,018; P=0,006; P=0,032; respectivamente).

A porcentagem das CEPs mostrou-se significativamente maior no grupo de 48 horas após a indução da TVP quando comparado com os grupos: CT, 15', 30', 45' e 1h (P=0,015; P=0,005; P=0,017; P=0,008; P=0,016; respectivamente).

No grupo de 72 horas a porcentagem das CEPs foi maior em relação os tempos: CT, 15', 30', 45' e 1h (P=0,003; P=0,002; P=0,014; P=0,004; P=0,021; respectivamente).

O grupo de 15 minutos apresentou uma porcentagem menor das CEPs em relação ao controle (P=0,03) (Figura 18).

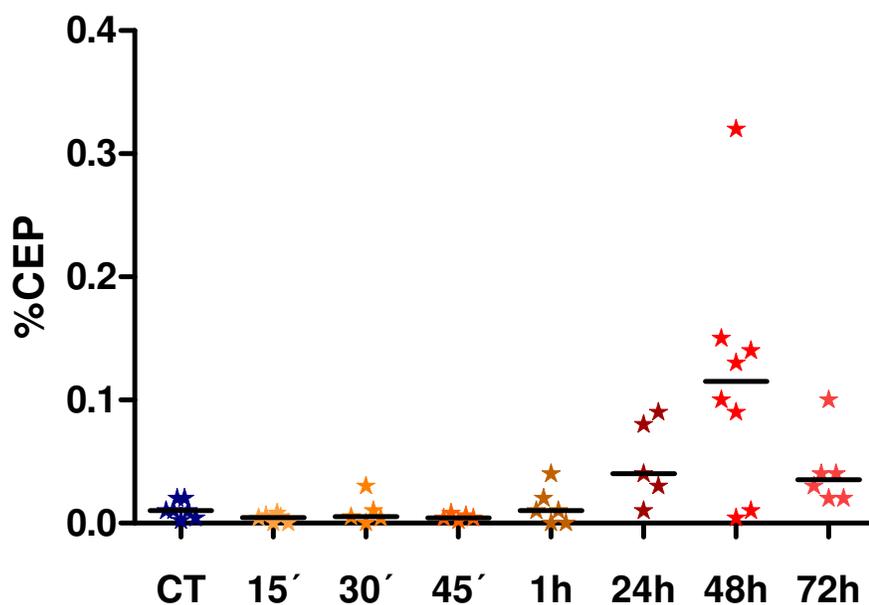


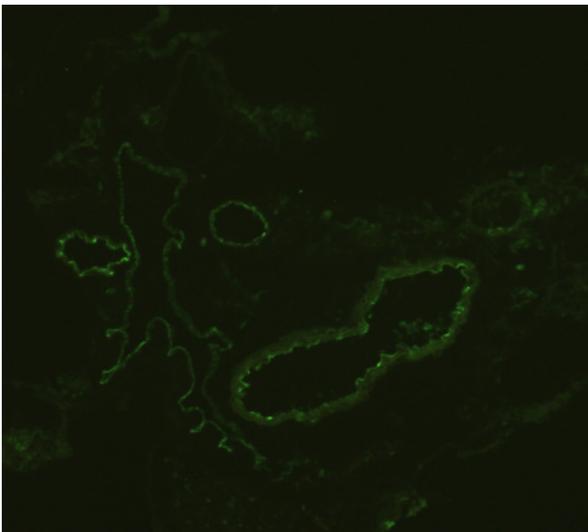
Figura 18. Representação gráfica da porcentagem das CEPs ($CD34^+$ VEGFR-2 $^+$ CD45 dim) de cada camundongo e mediana nos grupos estudados.

4.8- Identificação das CECs e CEPs no trombo venoso

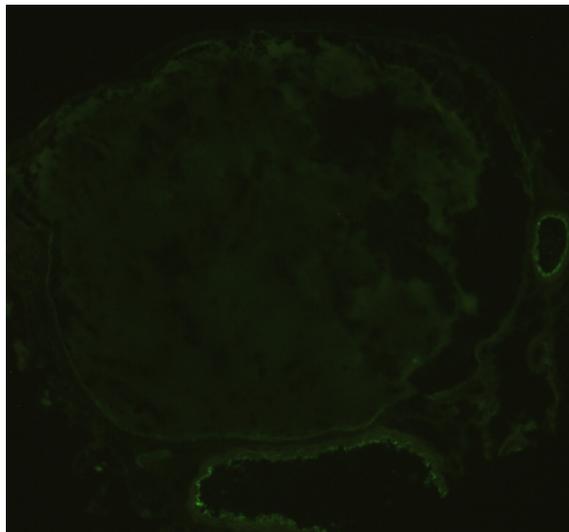
O método de imunofluorescência demonstrou ausência de células endoteliais ($CD31^+$) e células progenitoras ($CD34^+/Sca1^+$) dentro ou na periferia do trombo venoso.

A célula endotelial ($CD31^+$) foi observada no endotélio da aorta abdominal e arteríolas. Algumas células endoteliais foram marcadas na VCI do lado oposto onde foi colocado o papel filtro com 15% $FeCl_3$ e na região onde o fluxo foi restabelecido, após 24 horas (Figuras 19 a-h).

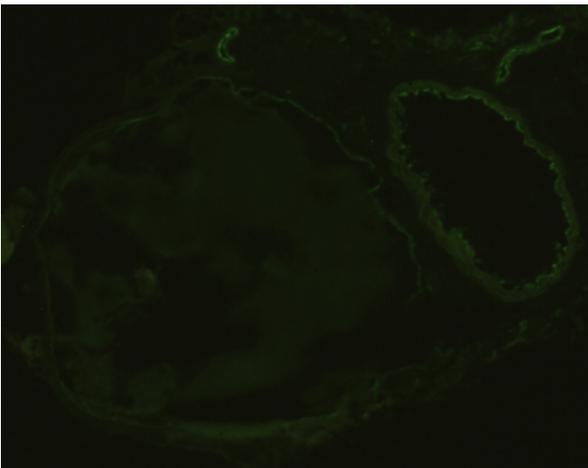
(a). Controle



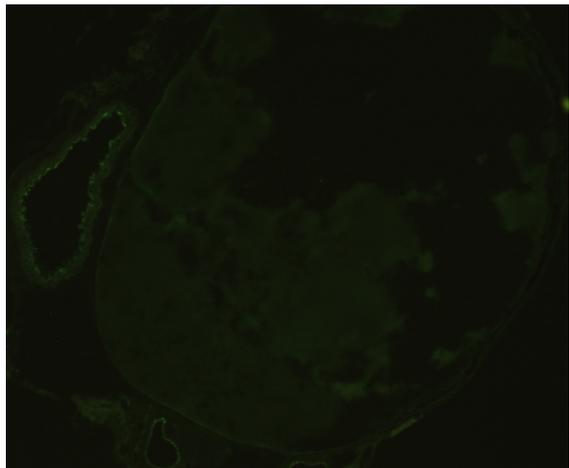
(b). 15 minutos



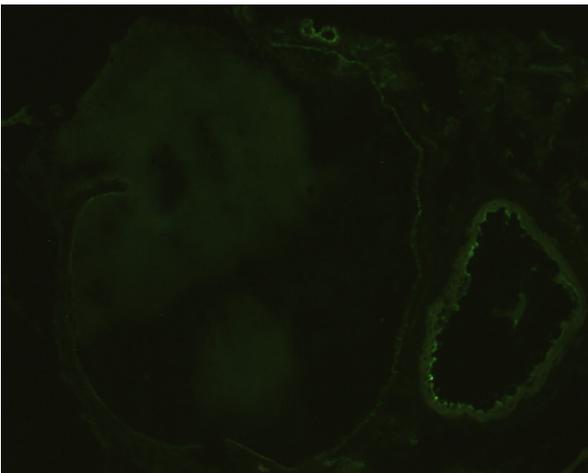
(c). 30 minutos



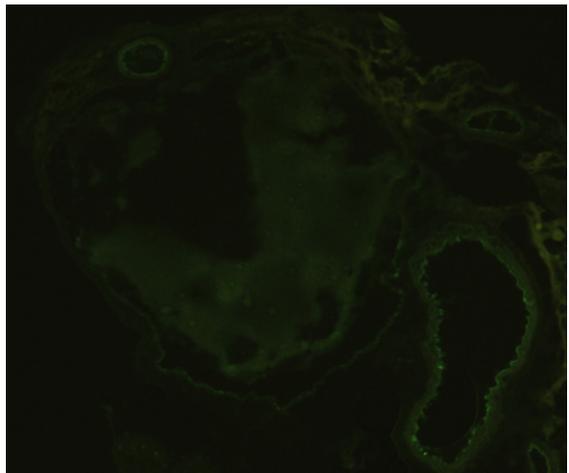
(d). 45 minutos



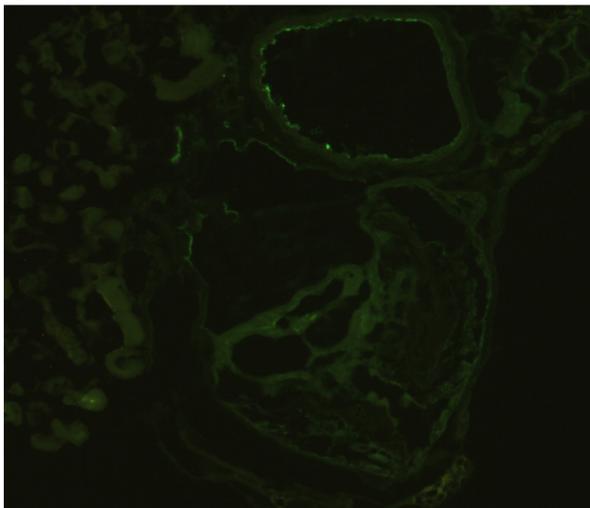
(e). 1 hora



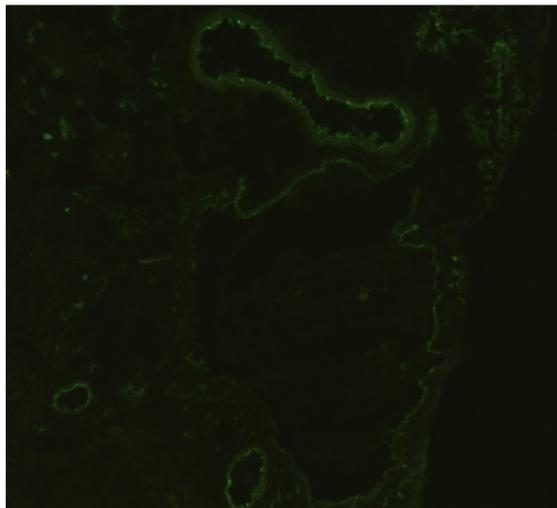
(f). 24 horas



(g). 48 horas



(h). 72 horas



Figuras 19 a-h. Imunofluorescência do trombo venoso (CD31). (a) controle; (b). 15 minutos; (c) 30 minutos; (d) 45 minutos; (e) 1 hora; (f) 24 horas; (g) 48 horas e (h) 72 horas.

5 – DISCUSSÕES

A TVP é uma doença prevalente, inclusive no Brasil, com uma incidência de 0,6 casos por 1.000 habitantes por ano (MAFFEI, 1998). A fisiopatologia da trombose baseia-se na Tríade de Virchow, em que alterações dos componentes do sangue, do fluxo sanguíneo ou do endotélio podem desencadear o processo trombótico. Fatores de risco genéticos e adquiridos estão bem definidos na literatura e, estão presentes em 80% dos pacientes, estando envolvidos na etiopatogenia da doença. Por outro lado, em aproximadamente 20% dos pacientes com TVP não se identifica nenhum fator de risco, o que pode corresponder a uma trombose espontânea ou a presença de fatores de risco desconhecidos (ANNICHINO-BIZZACCHI, 2004).

Qualquer que seja a causa principal da TVP, ela é responsável por até 90% de todas as embolias pulmonares (BORROW & GOLDSON, 1983). Nem sempre é clinicamente diagnosticada, ocorrendo um número considerável de óbitos devido a embolia pulmonar em pacientes que não apresentaram sinais precedentes de trombose (BELL & SIMON, 1982; HULL & HIRSH, 1981; COON, 1976).

A longo prazo, a TVP pode levar à síndrome pós-trombótica, que tem um grande impacto sobre a qualidade de vida e sobre os custos da assistência médica (NICOLAIDES, 1997). Essa complicação acomete 30-50% do pacientes com TVP de membros inferiores, nos primeiros cinco anos da doença e depende da extensão da trombose (NICOLAIDES, 1997). As principais conseqüências da síndrome pós-trombótica são: varizes secundárias, úlceras varicosas, eczema, erisipela, edema, dor e incapacidade para o trabalho. As úlceras venosas se desenvolvem em pelo menos 300/100.000 habitantes, e a proporção devida à TVP é de aproximadamente 25%. Estimou-se que o custo anual de tratamento das úlceras venosas seria de 400 milhões de libras para o Reino Unido e de mais de 1 bilhão de dólares para os Estados Unidos (NICOLAIDES, 1997).

Assim, a TVP é um importante problema de Saúde Pública, e pesquisas que visem a identificação de marcadores ou fatores de risco, que auxiliem no diagnóstico e tratamento são muito importantes na prática clínica.

Apesar do envolvimento do endotélio no processo trombótico venoso, a impossibilidade de uma análise direta do mesmo, dificulta a compreensão do seu real papel

na TVP. Uma possibilidade para explicar a ocorrência de TVP espontânea, seria a alteração endotelial como fator desencadeante, mas não diagnosticado.

Por outro lado, a TVP é uma doença multifatorial e, alterações do endotélio podem contribuir para os diversos fenótipos da doença diante de uma mesma alteração genética ou exposição a um fator de risco adquirido. Além disso, após um episódio de TVP, alterações endoteliais provocadas pela lesão direta do vaso ou decorrentes da alteração do fluxo sanguíneo na síndrome pós-trombótica podem contribuir para o risco de retrombose.

Números elevados de CECs foram previamente descritos em outras doenças que comprometem principalmente a microcirculação ou o endotélio arterial, como nas coronariopatias, na hipertensão arterial, nas infecções, no choque séptico, na doença de Behcet, no lupus eritematoso sistêmico e nas vasculites inflamatórias (SBARBATI *et al.*, 1991; GEORGE *et al.*, 1992; MUTIN *et al.*, 1999; SOLOVEY *et al.*, 1998; BULL *et al.*, 2003; MAKIN *et al.*, 2004). Esse aumento estaria relacionado à lesão endotelial, o que provocaria o desprendimento das células do vaso sanguíneo. Neste caso, poderiam ser detectadas CECs integras, em processo de apoptose ou necróticas, e liberação de micropartículas das mesmas.

Após o episódio agudo de TVP há lesão vascular, e na evolução os vasos acometidos podem se desobstruir ou não, mas sempre ocorre um dano com alteração em suas paredes e válvulas. Assim quando idealizamos este projeto, nossa hipótese era que devido a essas alterações venosas, quer na fase aguda ou crônica da TVP, houvesse aumento das CECs no sangue periférico. Caso isso se confirmasse, as mesmas poderiam constituir um marcador de lesão vascular em pacientes com TVP, e poderiam ser utilizadas junto com outros marcadores, como por exemplo, o dímero-D, tanto no diagnóstico como na definição do tempo de anticoagulação.

Nosso primeiro objetivo foi padronizar a identificação das CECs e CEPs pelo método de citometria de fluxo. Quando iniciamos este estudo observamos na literatura que vários grupos de pesquisa haviam caracterizado as CECs e CEPs por citometria de fluxo, utilizando painéis com diferentes anticorpos monoclonais (MANCUSO *et al.*, 2001; PEICHEV *et al.*, 2000). Os resultados desses estudos mostravam um número de células

muito diverso, levando ao questionamento se as células definidas como CECs e CEPs por alguns pesquisadores eram realmente as mesmas CECs e CEPs caracterizadas por outros. Esse foi um dado que dificultou a escolha de um painel ideal e confiável. Como exemplo, podemos citar o número de CECs em indivíduos saudáveis de $0,30\pm 0,24$ células/ μL e $2,40\pm 0,66$ células/ μL , descritos por MARIUCCI *et al.* (2008) e OZDOGU *et al.* (2007), respectivamente.

Assim, optamos por realizar um painel abrangente, com várias combinações de anticorpos, que permitisse a identificação de qualquer célula classificada como CEC ou CEP. Apesar de existirem propostas de padronização para identificação e quantificação das CECs e CEPs por citometria de fluxo, ainda hoje existem controvérsias (OZDOGU *et al.*, 2007; MARIUCCI *et al.*, 2008; VAN CRAENENBROECK *et al.*, 2008; DUDA *et al.*, 2007; MANCUSO *et al.*, 2009; JACQUES *et al.*, 2008; MASOULEH *et al.*, 2010; ESTES *et al.*, 2010).

Ao avaliarmos os nossos resultados, consideramos ter utilizado um painel adequado, que mostrou um número das CECs entre 0 a $0,34$ células/ μL e, praticamente ausência das CEPs no sangue periférico de indivíduos normais, de acordo com o descrito pela maioria dos pesquisadores que estudam lesão vascular ($0,006\pm 0,002$ células/ μL , MARIUCCI *et al.*, 2008; $0,18\pm 0,17$ células/ μL , MANCUSO *et al.*, 2009).

Além disso, como utilizamos mais de um painel (tubos com anticorpos monoclonais) para a identificação de uma mesma célula, e os resultados obtidos foram muito semelhantes entre eles, houve como uma validação entre as quantificações. Isso é uma prerrogativa importante para confiarmos nos resultados obtidos em pacientes com TVP.

Outro ponto a ser comentado é que pelo fato de termos utilizado apenas a citometria de fluxo para determinação das CECs e CEPs, o emprego de um painel abrangente foi essencial para a segurança no método.

Nosso estudo foi o primeiro a avaliar as CECs e CEPs em pacientes com TVP. Demonstramos que houve um aumento significativo de CECs no grupo de TVP na fase

aguda quando comparado aos outros grupos [(P=0,001 (CD144); P<0,001 (CD146); P=0,002 (VEGFR2)], mais expressivo em alguns pacientes. Após o episódio agudo houve uma diminuição no número de CECs, mas nem todos os pacientes na 2ª coleta ou do grupo TVP crônica apresentavam número normal dessas células. Assim nossos resultados sugerem que a lesão endotelial é mais importante na fase aguda, mas pode estar presente em pequeno grau nas fases tardias da doença. A síndrome pós-trombótica é muito prevalente em pacientes com TVP, e o aumento das CECs talvez tenha uma relação com essa complicação.

É interessante notar que 4 dos 9 pacientes avaliados na fase aguda tiveram um aumento muito relevante de CECs. Isso pode estar relacionado à extensão da trombose. Além disso, há uma variação importante entre o tempo dos primeiros sintomas e o diagnóstico de TVP, o que também poderia interferir com os resultados obtidos, pois as amostras podem corresponder a diferentes fases da doença, como obstrução inicial, total ou até recanalização do trombo.

Assim, os dados do nosso estudo são preliminares, mas apontam para uma melhor padronização da fase da coleta em relação aos sintomas de TVP, à extensão da mesma e sua evolução, para compreensão do papel da lesão endotelial na fisiopatologia da TVP.

Fatores de risco adquiridos para doença arterial como hipertensão, diabetes, antecedente de IAM, AVCi, obstrução arterial periférica e antecedente de doença arterial em familiares com idade inferior a 50 anos podem ter relação com o número das CECs e CEPs (MUTIN *et al.*, 1999; MAKIN *et al.*, 2004; QUILICI *et al.*, 2004). Assim investigamos se esses fatores de risco estavam presentes em nossos pacientes, e verificamos que foram mais prevalentes no grupo de TVP crônica, porém, não tiveram influência sobre o número de CECs em nosso estudo.

A ausência ou o número baixo das CEPs no sangue periférico dos pacientes deste estudo mostra que as células progenitoras são raras na circulação sanguínea. Nossos resultados demonstraram que a população das CEPs positivas para o marcador CD133 é raríssima quando comparada com a população de células positivas para o marcador CD34,

mostrando que as células mais precursoras estão praticamente ausentes no sangue periférico.

As CEPs podem participar do reparo endotelial, migrando da medula óssea para o local de lesão, promovendo a reendotelização pela sua transformação em célula endotelial ou por liberação de citocinas que estimulam a proliferação das células endoteliais locais. Nesse sentido poderíamos esperar que os pacientes com TVP apresentassem um aumento dessas células, mas apenas observamos um aumento não significativo nos pacientes na fase aguda, quando comparado aos outros grupos analisados. Isso não descarta que essas células tenham um papel local, mas que não pode ser demonstrado pela análise do sangue circulante.

Apesar da limitação do tamanho amostral, observou-se um aumento do número de leucócitos com neutrofilia no grupo de TVP ao diagnóstico. O número elevado de leucócitos é considerado um fator de risco para o tromboembolismo em pacientes com doença mieloproliferativa (STOFFEL *et al.*, 2010), mas não há relato na literatura de associação entre leucocitose e TVP. Assim, esse achado sugere um processo inflamatório agudo, com a participação dessas células, mas que deverá ser melhor investigado em projetos futuros.

Alguns pacientes com TVP aguda apresentaram hemoglobina inferior a 11,5mg/dL (n=5), mas isto pode ser explicado pela presença de menorragia nas mulheres (n=4). O único paciente do sexo masculino com anemia não evidenciou nenhum fator etiológico pela história clínica e em exame realizado após 6 meses do episódio agudo apresentava níveis normais de hemoglobina.

Investimos na padronização e análise de CECs e CEPs em um modelo animal, pois o mesmo permite análises não exequíveis em humanos. Assim, o modelo animal permitiu o controle do tempo entre a TVP e a coleta, com uma precisão importante para nossa análise. Assim, observamos que somente 48 horas após a indução da TVP houve um aumento relevante no número das CECs e CEPs. Antes da análise histológica do trombo imaginávamos que nesse período houvesse uma grande oclusão vascular, porém, para nossa surpresa, nessa fase apenas 60% do vaso estava obstruído. Uma das hipóteses para esses

achados é que as CECs se desprenderam do vaso quando se iniciou o restabelecimento do fluxo na VCI. O FeCl₃ causa lesão em uma face do vaso, e a trombose começa a se formar a partir desse ponto lesionado, aumentando gradativamente até a oclusão total do vaso em 8 a 10 minutos. Provavelmente as CECs da área trombosada ficam comprimidas e somente serão liberadas na circulação quando se inicia a recanalização.

Um dado interessante e que será investigado posteriormente foi a quantidade elevada de debrís observada na citometria de fluxo, paralela ao aumento de CECs. Esses debrís podem na verdade corresponder a CECs em apoptose, e sua análise contribuirá para elucidar nossas hipóteses, especialmente de esmagamento das células endoteliais durante a oclusão total do vaso.

Outra possibilidade para o aumento das CECs é que as mesmas seriam oriundas das CEPs, liberadas da medula óssea pelo estímulo da oclusão vascular. Observamos um aumento de CEPs 24 a 48h após a oclusão, o que favorece esta hipótese. Contudo, não podemos descartar que o aumento de CEPs tem um papel parácrino para as células endoteliais, durante processo de reendotelização.

Mondarai *et al.* (2006) avaliaram a presença das CECs e CEPs no sangue periférico e no trombo venoso em modelo murino de TVP, com o objetivo de determinar se as células da medula óssea (linhagem endotelial) estavam envolvidas na recanalização do trombo. A TVP foi induzida por lesão mecânica e estase venosa. Observou-se que as células progenitoras da medula óssea são recrutadas para o trombo, mas apenas expressam um fenótipo de macrófagos, não participando da recanalização do mesmo. Isso leva à especulação de que processos de revascularização que ocorrem durante a resolução do trombo envolvem células endoteliais maduras, derivadas de vasos da VCI e que o estímulo para isso foi fornecido pelas células progenitoras derivadas da medula óssea encontradas dentro do trombo.

Estes resultados foram observados em outro estudo (ZIEGELHOEFFER *et al.*, 2004) que demonstrou que as células derivadas da medula óssea são recrutadas para áreas isquêmicas, porém não integram os novos vasos recém-formados, mas expressam uma variedade de citocinas que podem estimular a angiogênese.

Um dado importante de ser discutido refere-se a complementaridade de exames na interpretação dos resultados. O peso da peça cirúrgica nos diversos tempos de análise sugeria que o trombo permanecia *in loco* até 72 horas após sua indução. Contudo, a análise histológica revelou que em 24 horas já começa a desobstrução do vaso e que o peso se mantém o mesmo pela presença de um material fibroso ao redor dos vasos.

Finalizando, podemos concluir que os objetivos deste estudo foram atingidos em quase sua totalidade, e que na verdade abriu muitas questões interessantes, dignas de serem investigadas, para uma melhor compreensão da participação do endotélio na TVP.

6 - CONCLUSÕES

De acordo com os objetivos inicialmente propostos neste estudo, concluímos que:

Objetivo 1. Padronizar a identificação das CECs e CEPs no sangue periférico.

A identificação e quantificação das CECs e CEPs por citometria de fluxo demonstrou ser um método adequado, apesar da raridade dessas células. A baixa expressão dos antígenos endoteliais utilizados (CD144, CD146 e VEGFR2) mostrou que é imprescindível a inclusão do marcador endotelial CD31 para determinar esta população de células raras. O uso de um painel com 3 tubos foi importante para validação dos resultados.

Objetivo 2. Identificar e quantificar as CECs e CEPs em pacientes com TVP na fase aguda, em pacientes com TVP crônica e, em um grupo controle;

Nossos resultados mostraram um aumento de CECs em TVP na fase aguda, com maior relevância em alguns pacientes. Esses dados sugerem um processo de lesão endotelial. O aumento de CECs (CD144, CD146) observado nos pacientes com TVP na fase crônica foi menor, e pode corresponder a uma lesão endotelial secundária à síndrome pós-trombótica.

Objetivo 3. Realizar uma análise prospectiva das CECs e CEPs nos pacientes com TVP aguda;

Os resultados verificados após o episódio agudo sugerem que houve uma recuperação da integridade vascular, melhor observado nos pacientes com maior aumento das CECs na fase aguda. O tempo decorrido entre a TVP e a coleta pode ser um fator importante na detecção dessas células na fase aguda.

Objetivo 4. Padronizar um modelo de trombose venosa profunda induzida por lesão endotelial em camundongos;

O modelo animal de TVP induzido por lesão endotelial foi satisfatório porque promoveu a oclusão somente da veia cava inferior. A utilização de uma *probe* para medir o fluxo foi fundamental para a padronização da concentração de FeCl₃ e, conseqüentemente determinar o tempo de oclusão.

Objetivo 5. Avaliar as CECs e CEPs no sangue periférico e no trombo venoso do modelo animal.

O aumento do número de CEPs após 24-48h da indução da TVP sugere que houve recrutamento de células endoteliais da medula óssea para a circulação, podendo participar do processo de reparo endotelial. O aumento do número de CECs após 24 a 48h da indução da TVP, na fase em que se inicia o processo de recanalização, sugere que apesar da lesão endotelial inicial, as mesmas apenas são liberadas quando o fluxo começa a ser restabelecido. As CECs podem constituir um marcador de dano vascular.

7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANNICHINO-BIZZACCHI, J.M. Avaliação clínica, laboratorial, e molecular de pacientes brasileiros portadores de trombose venosa. Campinas, (Tese - Livre Docência - Universidade Estadual de Campinas), 2004.

ASAHARA, T.; MUROHARA, T.; SULLIVAN, A.; *et al.* Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. **Science**, 275: 964-7, 1997.

BELL, W. R.; SIMON, T. L. Current status of pulmonary thromboembolic disease: pathophysiology, diagnosis, prevention, and treatment. **Am Heart J**, 103: 239-62, 1982.

BERTINA, R.M.; KOELEMAN, R.C.; KOSTER, T.; *et al.* Mutation in blood coagulation factor V associated with resistance to activated protein C. **Nature**, 369: 64-7, 1994.

BLANN, A.D.; NOTEBOOM, W.M.; ROSENDAAL, F.R. Increased soluble P-selectin levels following deep venous thrombosis: cause or effect? **Br J Haematol**, 108:191-3, 2000.

BORROW, M; GOLDSON, H. J. Prevention of postoperative deep venous thrombosis and pulmonary embolis with combined modalities. **Am Surg**, 49: 599-605, 1983.

BOUVIER, C.A.; GAYNOR, E.; CINTRON, J.R.; BERNHARDT, B.; SPAET, T.H. Circulating endothelium as an indicator of vascular injury. **Thromb Diath Haemorrh**, 40: 163-8, 1970.

BULL, T.M.; GOLPON, H.; HEBBEL, R.P.; *et al.* Circulating endothelial cells in pulmonary hypertension. **Thromb Haemost**, 90: 698-703, 2003.

BUSTIN, S.A. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. **J Mol Endocrinol**, 25:169-93, 2000.

CAMOIN-JAU, L.; KONE-PAUT, I.; CHABROL, B.; SAMPOL, J.; DIGNAT-GEORGE, F. Circulating endothelial cells in Behcet's disease with cerebral thrombophlebitis. **Thromb Haemost**, 83: 631-2, 2000.

CINES, D.B.; POLLAK, E.S.; BUCK, C.A.; *et al.* Endothelial cells in physiology and in the pathophysiology of vascular disorders. **Blood**, 91: 3527-61, 2001.

CLANCY, R.; MARDER, G.; MARTIN, V.; BELMONT, H.M.; ABRAMSON, S.B.; BUYON, J. Circulating activated endothelial cells in systemic lupus erythematosus: further evidence for diffuse vasculopathy. **Arthritis Rheum**, 44: 1203-8, 2001.

COON, W. W. The spectrum of pulmonary embolism. **Arch Surg**, 111: 398-402, 1976.

DAHLBÄCK, B.; CARLSSON, M.; SVENSSON, P.J. Familial thrombophilia due to a previously unrecognized mechanism characterized by poor anticoagulant response to activated protein C: prediction of a cofactor to activated protein C. **Proc Natl Acad Sci USA**, 90:1004-8, 1993.

DIGNAT-GEORGE, F.; SAMPOL, J. Circulating endothelial cells in vascular disorders: new insights into an old concept. **Eur J Haematol**, 65: 215-20, 2000.

DIGNAT-GEORGE, F.; SAMPOL, J.; LIP, G.; BLANN, A.D. Circulating endothelial cells: realities and promises in vascular disorders. **Pathophysiol Haemost Thromb**, 33: 495-9, 2004.

DOWNING, L.J.; STRIETER, R.M.; KADELL, A.M.; *et al.* Il-10 regulates thrombus-induced vein wall inflammation and thrombosis. **J Immunol**, 161: 1471-76, 1998.

DUDA, G.D.; COHEN, K.S.; SCADDEN, D. T.; JAIN, R.K. A protocol for phenotypic detection and enumeration of circulating endothelial cells and circulating progenitor cells in human blood. **Nat Protoc**, 2: 805-10, 2007.

ESTES, M. L.; MUND, J.A.; MEAD, L.E.; PRATER, D.N.; CAI, S.; WANG, H.; POLLOK, K. E.; MURPHY, M. P.; AN, C.S.T.; SROUR, E.F.; INGRAM JR, D.A.; CASE, J. Application of polychromatic flow cytometry to identify novel subsets of circulating cells with angiogenic potential. **CytometryA**, 77: 831-9, 2010.

GEORGE, F. ; BROUQUI, P. ; BOFFA, M.C. ; *et al.* Demonstration of Rickettsia conorii-induced endothelial injury in vivo by measuring circulating endothelial cells, thrombomodulin, and von Willebrand factor in patients with Mediterranean spotted fever. **Blood**, 82:2109-16, 1993.

GEORGE, F.; BRISSON, C.; PONCELET, P.; *et al.* Rapid isolation of human endothelial cells from whole blood using S-Endo 1 monoclonal antibody coupled to immuno-magnetic beads: demonstration of endothelial injury after angioplasty. **Thromb Haemost**, 67: 147-153, 1992.

GREFTE, A.; VAN DER GIESSEN, M.; VAN SON, W.; THE, H. Circulating cytomegalovirus infected endothelial cells in patients with an active CMV infection. **J Infect Dis**, 167: 270-7, 1993.

HANSON, P.O.; WERLIN, L.; TIBBLIN, G.; ERIKSSON, H. Deep vein thrombosis and pulmonary embolism in the general population. **Archives Internal Medicine**, 157: 1665-70, 1997.

HEIJBOER, H.; BRANDJES, D.P.M.; BÜLLER, H.R.; STURK, A.; CATE, J.W. Deficiencies of coagulation-inhibiting and fibrinolytic proteins in outpatients with deep-vein thrombosis. **N Engl J Med**, 323:1512-16, 1990.

HENKE, P.K.; DEBRUNYE, L.A.; STRIETER, R.M.; *et al.* Viral IL-10 gene transfer decreases inflammation and cell adhesion molecule expression in a rat model of venous thrombosis. **J Immunol**, 164: 2131-41, 2000.

HIGUCHI, R.; FOCKLER, C.; DOLLINGER, C.; WATSON, R. Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. **Biotechnology**, 11: 1026-30, 1993.

HLADOVEC, J.; ROSSMAN, P. Circulating endothelial cells isolated together with platelets and the experimental modification of their counts in rats. **Thromb Res**, 3:665-674, 1973.

HULL, R. D.; HIRSH, J. Advances and controversies in the diagnosis, prevention, and treatment of venous thromboembolism. **Prog Haematol**, 12: 73-123, 1981.

JACQUES, N.; VIMOND, N.; CONFORTI, R.; GRISCELLI, F.; LECLUSE, Y.; LAPLANCHE, A.; MALKA, D.; VIELH, P.; FARACE, F. Quantification of circulating mature endothelial cells using a whole blood four-color flow cytometric assay. **J Immunol Methods**, 337: 132-43, 2008.

KOSTER, T.; ROSENDAAL, F.R.; DE RONDE, H.; BRITËT, E.; VANDENBROUCKE, J.P.; BERTINA, R.M. Venous thrombosis due to a poor anticoagulant response to activated protein C: Leiden Thrombophilia Study. **Lancet**, 342:1503-06, 1993.

LEFEVRE, P.; GEORGE, F.; DURAND, J.M.; SAMPOL, J. Detection of circulating endothelial cells in thrombotic thrombocytopenic purpura. **Thromb Haemost**, 69: 522, 1993.

MAFFEI, F.H.A. Epidemiologia da trombose venosa profunda e de suas complicações no Brasil. **Cir Vasc Angiol**, 14:5-8, 1998.

MAKIN, A.; CHUNG N.A.Y.; SILVERMAN, S.H.; *et al.* Assessment of endothelial damage in atherosclerotic vascular disease by quantification of circulating endothelial cells. **Eur Heart J**, 25: 371-6, 2004.

MAKIN, A.; CHUNG, NAY.; SILVERMAN, SH.; BLANN, A.; LIP, G.Y. Assessment of endothelial damage in atherosclerotic vascular disease by quantification of circulating endothelial cells. **Eur Heart J**, 25:371-6, 2004.

MANCUSO, P.; ANTONIOTTI, P.; QUARNA, J.; CALLERI, A.; RABASCIO, C.; TACCHETTI, C.; BRAIDOTTI, P.; WU, H.; ZURITA, A. J.; SARONNI, L.; CHENG, J.B.; SHALINSKY, D. R.; HEYMACH, J.V.; BERTOLINI, F. Validation of standardized method for enumerating circulating endothelial cells and progenitors: flow cytometry and molecular and ultrastructural analyses. **Clin Câncer Res**, 15: 267-73, 2009.

MANCUSO, P.; BURLINI, A.; PRUNERI, G.; GOLDHIRSCH, A.; MARTINELLI, G.; BERTOLINI, F. Resting and activated endothelial cells are increased in the peripheral blood of cancer patients. **Blood**, 97: 3658-61, 2001.

MARIUCCI, S.; ROVATI, B.; BENCARDINO, K.; MANZONI, M.; DANOVA, M. Flow cytometric detection of circulating endothelial cells and endothelial progenitor cells in healthy subjects. **Int Jnl Lab Hem**, 32: 40-8, 2008;

MASOULEH, B.K.; BARANISKIN, A.; SCHMIEGEL, W.; SCHROERS, R. Quantification of circulating endothelial progenitor cells in human peripheral blood: establishing a reliable flow cytometry protocol. **J Immunol Methods**, 357: 38-42, 2010.

MELLO, T.B.; MACHADO, T.F.; MONTAVÃO, S.A.; OZELLO, M.C.; ANNICHINO-BIZZACCHI, J.M. Assessing the coagulation factor levels, inherited thrombophilia, and ABO blood group on the risk for venous thrombosis among Brazilians. **Clin Appl Thromb Hemost**, 15: 408-14, 2009.

MELLO, T.B.; ORSI, F.L.; MONTAVÃO, S.A.; OZELO, M.C.; de PAULA, E.V.; ANNICHINO-BIZZACCHI, J.M. Long-term prospective study of recurrent venous thromboembolism in a Hispanic population **Blood Coagul Fibrinolysis**, 2010.

MELLO, T.B.; SIQUEIRA, L.H.; MONTAVÃO, S.A.; OZELLO, M.C.; ANNICHINO-BIZZACCHI, J.M. Low density lipoprotein receptor-related protein polymorphisms are not risk factors for venous thromboembolism. **Thromb Res**, 121: 625-9, 2008.

MONDARAI, B.; BURNAND, K.G.; SAWYER, B.; SMITH, A. Endothelial progenitor cells are recruited into resolving venous thrombi. **Circulation**, 111: 2645-53, 2006.

MUTIN, M.; CANAVY, I.; BLANN, A.; BORY, M.; SAMPOL, J.; DIGNAT-GEORGE, F. Direct evidence of endothelial injury in acute myocardial infarction and unstable angina by demonstration of circulating endothelial cells. **Blood**, 93: 2951-8, 1999.

MUTUNGA, M.; FULTON, B.; BULLOCK, R.; *et al.* Circulating endothelial cells in patients with septic shock. **Am J Respir Crit Care Med**, 163: 195-200, 2001.

NAKATANI, K.; TAKESHITA, S.; TSUJIMOTO, H.; KAWAMURA, Y.; TOKUTOMI, T.; SEKINE, I. Circulating endothelial cells in Kawasaki disease. **Clin Exp Immunol**, 131: 536-40, 2003.

NICOLAIDES, A. N. Prevention of venous thromboembolism. **Int Ang**, 16: 3-38, 1997.

OZDOGU, H.; SOZER, O.; BOGA, C.; KOZANOGLU, I.; MAYTALMAN, E., GUZEY, M. Flow cytometric evaluation of endothelial cells: a new protocol for identifying endothelial cells at several stages of differentiation. **Am J Hematol**, 2007.

PEARSON, J.D. Endothelial cell function and thrombosis. **Baillieres Best Pract Res Clin Haematol**, 12: 329-41, 2002.

PERCIVALLE, E.; REVELLO, M.G.; VAGO, L.; MORINI, F.; GERNA, G. Circulating endothelial giant cells permissive for human cytomegalovirus are detected in disseminated HCMV infections with organ involvement. **J Clin Invest**, 92: 663-70, 1993.

PETERSON, J.; ZUCKER, M.B. The effects of adenosine monophosphate, arcaïne and anti-inflammatory agents on thrombosis and platelet function on rabbits. **Thromb Diath Haemorrh**, 23: 148-58, 1970.

POORT, S.R.; ROSENDAAL, F.R.; REITSMA, P.H.; BERTINA, R.M. A common genetic variation in the region of the prothrombin gene is associated with elevated plasma prothrombin levels and an increase in venous thrombosis. **Blood**, 88: 3698-3703, 1996.

QUILICI, J.; BANZET, N.; PAULE, P.; *et al.* Circulating endothelial cell count as a diagnostic marker for non-ST elevation acute coronary syndromes. **Circulation**, 110: 1586-91, 2004.

RAFII, S.; LYDEN, D.; BENEZRA, R. Vascular and haemopoietic stem cells: novel target for anti angiogenesis therapy. **Nat Rev Cancer**, 2: 826-835, 2002.

REYERS, I.; MUSSONI, L.; DONATTI, M.B.; DE GAETANO, G. Failure of aspirin at different doses to modify experimental thrombosis in rats. **Thromb Res**, 18: 669-74, 1980.

ROBBINS, S.L. ; KUMAR, V. ; COTRAN, R.S. ; *et al.* Patologia estrutural e funcional. Rio de Janeiro: Editora Koogan, 1277p, 1996.

ROBERTORYE, R.S.; RODGER, S G.M. Update on selected inherited venous thrombotic disorders. **Am J Hematol**, 68: 256-68, 2001.

ROSENDAAL, F.R. Risk factors for venous thrombotic disease. **Thromb Haemost**, 82:610-9, 1999.

ROSENDAAL, F.R. Venous thrombosis: the role of genes, environment, and behavior. **Hematology**, 1 :1-12, 2005.

ROSENDAAL, F.R.; KOSTER, T.; VANDENBROUCKE, J.P. High risk of thrombosis in patients homozygous for factor V Leiden (activated protein C resistance). **Blood**, 85:1504-8, 1995.

SBARBATI, R.; DE BOER, M.; MARZILLI, M.; SCARLATTINI, M.; ROSSI, G.; VAN MOURIK, J.A. Immunologic detection of endothelial cells in human whole blood. **Blood**, 77: 764-9, 1991.

SEIXAS CA, HESSEL G, RIBEIRO CC, ARRUDA VR, ANNICHINO-BIZZACCHI JM. Factor V Leiden is not common in children with portal vein thrombosis. **Thromb Haemost**, 77: 258-61, 1997.

SELIGSHN, U.; ZIVELIN, A. Thrombophilia as a multigenic disorder. **Thromb Haemost**, 78: 297-301, 1997.

SHI, Q.; RAFII, S.; WU, MH.; *et al.* Evidence for circulating bone marrow-derived endothelial cells. **Blood**, 92: 362-7, 1998.

SILVERSTEIN, M.D.; HEIT, J.A.; MOHR, D.N.; PETTERSON, T.M.; O'FALLON, W.M.; MELTON, L.J. Trends in the incidence of deep vein thrombosis and pulmonary embolism. **Arch Intern Med**, 158: 585-93, 1998.

SINGH I, SMITH A, VANZIELEGHEM B, *et al.* Antithrombotic effects of controlled inhibition of factor VIII with a partially inhibitory human monoclonal antibody in a murine vena cava thrombosis model. **Blood** 2002, 99:3235-40.

SOLOVEY, A.; GUI, L.; KEY, N.S.; HEBBEL, R.P. Tissue factor expression by endothelial cells in sickle cell anaemia. **J Clin Invest**, 101: 1899-1904, 1998.

STOFFEL, N.; RYSLER, C.; BUSER, A.; GRATWOHL, A.; TSAKIRIS, D.A.; STERN, M. Leukocyte count and risk of thrombosis in patients undergoing haematopoietic stem cell transplantation or intensive chemotherapy. **Thromb Haemost**, 103: 1228–32, 2010.

TORRESAN, M.; MACHADO, T.F.G.S.; SIQUEIRA, L.H.; OZELO, M.C.; ARRUDA, V.R.; ANNICHINO-BIZZACCHI, J.M. The impact of the search for thrombophilia risk factors among antiphospholipid syndrome patients with thrombosis. **Blood Coagul Fibrinolysis**, 11:1–4, 2000.

VAN CRAENENBROECK, E.M.F.; CONRAADS, V.M.A.; VAN BOCKSTAELE, D.R.; HAINE, S.E.; VERMEULEN, K.; VAN TENDELOO, V.F.; VRINTS, C.J.; HOYMANS, V.Y. Quantification of circulating endothelial progenitor cells: a methodological comparison of six flow cytometric approaches. **J Immunol Methods**, 332: 31-40, 2008.

VAPAATALO, H.; MERVAALA, E. Clinically important factors influencing endothelial function. **Med Sci Monit**, 7: 1075-85, 2001.

WAKEFIELD, T.W.; LINN, M.J.; HENKE, P.K.; *et al.* Neovascularization during venous thrombus organization: a preliminary study. **J Vas Surg**, 30: 885-93, 1999.

WAKEFIELD, T.W.; STRIETER, R.M.; WILKE, C.A.; *et al.* Venous thrombosis-associated inflammation and attenuation with neutralizing antibodies to cytokines and adhesion molecules. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, 15: 258-68, 1995.

WANG, X.; SMITH, P.L.; HSU, M-Y.; OGLETREE, M.L.; SCHUMACHER, W.A. Murine model of ferric chloride-induced vena cava thrombosis: evidence for effect of potato carboxypeptidase inhibitor. **J Thromb Haemost**, 4: 403-10, 2006.

WESSLER, S. Thrombosis in the presence of vascular stasis. **Am J Med**, 33: 648-50, 1962.

WOYWODT, A.; SCHEER, J.; HAMBACH, L.; *et al.* Circulating endothelial cells as a marker of endothelial damage in allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. **Blood**, 103: 3603-5, 2004.

WOYWODT, A.; STREIBER, F.; DE GROOT, K.; REGELSBERGER, H.; HALLER, H.; HAUBITZ, M. Circulating endothelial cells as markers for ANCA-associated small-vessel vasculites. **Lancet**, 361: 206-10, 2003.

ZIEGELHOEFFER, T.; FERNANDEZ, B.; KOSTIN, S.; HEIL, M.; VOSWINCKEL, R.; HELISCH, A.; SCHAPER, W. Bone marrow-derived cells do not incorporate into the adult growing vasculature. **Circ Res**, 94: 230-8, 2004.

8 - ANEXOS

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Título do Projeto: ***AVALIAÇÃO DAS CÉLULAS ENDOTELIAIS CIRCULANTES NA TROMBOSE VENOSA PROFUNDA: PACIENTES E MODELOS ANIMAIS.***

Responsáveis pelo projeto: *Profa. Dra. JOYCE M. ANNICHINO-BIZZACCHI*

ALINE MORANDI ALÉSSIO

Eu, _____,

idade: _____, Data de Nascimento: _____, RG: _____,

HC: _____, Residente à Rua/Av.: _____

CEP: _____, Telefones: _____.

Concordo em participar do presente estudo, após estar absolutamente esclarecido (a) dos propósitos do mesmo.

Responsável pelo sujeito de pesquisa: _____,

Idade: _____, RG: _____, Grau de Parentesco: _____,

Residente à Rua/Av. _____

CEP: _____, Telefones: _____.

Este estudo pretende identificar se existe alguma relação entre o número das células que compõem a parede do vaso e a trombose.

Deveremos coletar 20mL de sangue para a avaliação dessas células e para analisar a coagulação do sangue (teste de geração do fragmento₁₊₂ da protrombina).

É essencial que o senhor (a) tenha feito jejum de no mínimo 4 horas antes da coleta para maior confiabilidade nos resultados dos exames.

Eventualmente, o senhor (a) poderá ser reconvocato a comparecer ao hospital, para nova coleta de material, com a finalidade de confirmar os resultados do exame.

Os riscos a que o senhor (a) estará sujeito ao participar da coleta são hematoma (mancha roxa) e/ou pequena dor no local da punção venosa. Este estudo não oferecerá aos sujeitos da pesquisa outros riscos importantes.

O benefício esperado na sua participação seria a sua contribuição para melhor entendimento desta doença e conseqüentemente um tratamento mais eficaz para este tipo de doença.

Outras informações:

1. Haverá reembolso de gastos com transporte e alimentação, em conseqüência de convocação para comparecimento ao hospital, exclusivamente para a pesquisa.
2. O voluntário estará livre para desistir do estudo a qualquer tempo, mesmo que inicialmente tenha concordado em fazê-lo.
3. O voluntário poderá tirar todas as dúvidas que tiver, ou que apareçam durante o estudo, sobre o mesmo, havendo o compromisso do pesquisador em respondê-las.
4. O material colhido neste estudo será utilizado somente para os objetivos propostos e gostaríamos de saber se o senhor (a) concorda que este material possa ser armazenado.

Sim Não

5. Caso seja realizado um outro estudo com este material, o senhor (a) será devidamente informado e questionado se concorda na participação de um outro estudo. Este novo estudo deverá ser novamente submetido à apreciação do CEP.
6. Todas as informações obtidas pelo estudo terão um caráter sigiloso e confidencial e serão usadas apenas com a finalidade de divulgação e publicação científica, e sua identidade será sempre preservada.
7. A sua discordância em participar do estudo não lhe acarretará nenhum prejuízo em qualquer outro tratamento ou procedimento que possa necessitar futuramente em qualquer serviço de nosso hospital.

Qualquer tipo de queixa ou reclamação relacionada a esta pesquisa o senhor (a) poderá entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da FCM-UNICAMP (Fone: (19) 3521-8936)

Campinas ____/____/____

Assinatura do Voluntário

Aline Morandi Aléssio
Aluna de pós-graduação
Fone: (19) 3521-8755

Profa.Dra. Joyce M. Annicchino-Bizzachi
Orientadora
Fone: (19) 3788-8601

QUESTIONÁRIO – Data da Coleta: __/__/__

Nome do Voluntário:			
HC:	Data de nascimento:		
Idade:	Sexo:	Feminino	Masculino
Origem étnica:	Caucasóide Afro-descendente Asiática Indígena		
História Pessoal de trombose venosa profunda (TVP), ou acidente vascular cerebral (AVC), ou infarto agudo do miocárdio (IAM): Sim Não. Qual?.....Data:			
História Familiar de TVP, ou AVC, ou IAM: Sim Não. Qual?.....			
Grau de parentesco:.....; Idade:			
Sofre de algumas destas doenças:			
Hipertensão arterial: Sim Não			
Síndromes Mieloproliferativas: Sim Não			
Anemia Falciforme: Sim Não			
Doenças infecciosas: Sim Não			
Doenças auto-imunes: Sim Não			
Doença Hepática: Sim Não			
Doenças cardiovasculares: Sim Não			
Neoplasias: Sim Não			
Síndrome do anticorpo antifosfolípido: Sim Não			
Transplante: Sim Não			
Diabetes: Sim Não			
Doença Renal: Sim Não			
Outras:			
Tabagismo:	Nunca fumou	Já fumou	Fuma. Quantos cigarros/dia? Quanto tempo?
Faz uso de algum medicamento?	Sim	Não. Qual?	



CEP, 17/07/06.
(Grupo III)

PARECER PROJETO: Nº 260/2006 (Este nº deve ser citado nas correspondências referente a este projeto)
CAAE: 0192.0.146.000-06

I-IDENTIFICAÇÃO:

PROJETO: “AVALIAÇÃO DAS CÉLULAS ENDOTELIAIS NA TROMBOSE VENOSA PROFUNDA: PACIENTES E MODELOS ANIMAIS”

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Aline Morandi Aléssio

INSTITUIÇÃO: HEMOCENTRO/UNICAMP

APRESENTAÇÃO AO CEP: 07/06/06

APRESENTAR RELATÓRIO EM: 28/06/07 (O formulário encontra-se no *site* acima)

II - OBJETIVOS

Avaliar e caracterizar a presença de células endoteliais circulantes (CECs) em pacientes com TVP e em portadores assintomáticos de trombofilia; verificar a correlação entre a presença de CECs e a evolução clínica dos pacientes; padronizar um modelo animal de trombose venosa e avaliar e caracterizar as CECs no trombo, durante a fase aguda da trombose venosa em modelos animais.

III - SUMÁRIO

Serão avaliados 10 pacientes com TVP de membros inferiores ao diagnóstico e após 6 meses de tratamento; 10 pacientes com TVP e SAF; 10 pacientes portadores de fator V de Leiden sem TVP prévia provenientes do ambulatório de hemostasia do Hemocentro/Unicamp e 10 controles. Critérios de inclusão e exclusão definidos. Os pacientes responderão questionário com história pregressa e uso de medicamentos. Serão coletados 20 ml de sangue periférico para análise das CECs e CEPs por citometria de fluxo e teste de geração de fragmento 1+2 da protombina, PCR quantitativo em tempo real. No modelo animal, em ratos, serão utilizados 10-15 animais e o projeto deverá estar de acordo com o Comitê de Ética para manipulação animal.

IV - COMENTÁRIOS DOS RELATORES

Estudo interessante, sem riscos para os participantes. O Termo de Consentimento foi readequado, estando de acordo com as normas da Resolução 196/96 e complementares. Orçamento de R\$ 48.000,00, trabalho submetido à FAPESP e ao CNPq.



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, bem como ter aprovado o Termo do Consentimento Livre e Esclarecido, assim 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.).

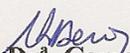
O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Res. CNS Item V.4.). É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e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

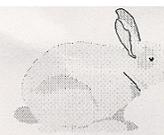
VII - DATA DA REUNIÃO

Homologado na VI Reunião Ordinária do CEP/FCM, em 28 de junho de 2006.


Prof.ª Dr.ª Carmen Silvia Bertuzzo
PRESIDENTE DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
FCM / UNICAMP



UNICAMP



CEUA/Unicamp

Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA/Unicamp

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 2121-1, sobre "Avaliação das células endoteliais circulantes na trombose venose profunda: pacientes e modelos animais", sob a responsabilidade de Profa.Dra. Joyce Maria Annichino-Bizzacchi / Aline Morandi Aléssio, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/Unicamp em 24 de junho de 2010

CERTIFICATE

We certify that the protocol nº 2121-1, entitled " _____ ", is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Research (State University of Campinas - Unicamp) on June 24, 2010.

Campinas, 24 de junho de 2010.

Profa. Dra. Ana Maria A. Guaraldo
Presidente

Fátima Alonso
Secretária Executiva

ANEXO 5

Controles	CT - 01	CT - 02	CT - 03	CT - 04	CT - 05	CT - 06	CT - 07	CT - 08	CT - 09	CT - 10	CT - 11
Gênero	Masculino	Masculino	Feminino	Feminino	Feminino	Feminino	Feminino	Feminino	Feminino	Feminino	Feminino
Origem étnica	Afro-descendente	Afro-Indígena	Caucasóide	Caucasóide	Caucasóide	Caucasóide	Caucasóide	Afro-Indígena	Indígena	Caucasóide	Caucasóide
Data de nascimento	21/2/1979	3/7/1984	16/3/1979	10/1/1959	1/10/1978	16/6/1987	2/8/1968	5/4/1980	21/4/1975	11/1/1963	1/11/1957
Data da coleta	11/1/2008	11/1/2008	5/3/2008	14/2/2008	25/9/2008	10/12/2008	10/12/2008	16/12/2008	16/12/2008	26/4/2010	26/4/2010
Idade na coleta	28	23	28	49	29	21	40	28	33	47	52
Trombofilia hereditária	não	não	não	não	não	não	não	não	não	não	não
Contraceptivo Hormonal (CH)	não	não	não	não	sim	não	não	não	não	não	não
Hemácias (M/μL)	5,26	4,91	4,39	4,29	4,68	4,69	5,16	5,45	4,77	4,45	5,02
Hb (g/dL)	15,9	15,9	12,9	12,9	14	12,8	10,2	14,4	12,7	13,6	13,8
Ht (%)	45,7	46,2	38,2	38,3	42,5	40,4	34,5	45,5	39,8	40,9	42,3
VCM (fl)	86,9	94,1	87,1	90,3	90,9	86,2	66,8	83,5	83,4	91,8	84,3
HCM (pg)	30,2	32,4	29,4	30,5	29,9	27,3	19,8	26,4	26,6	30,6	27,5
CHCM (g/dL)	34,8	34,4	33,8	33,6	32,9	31,7	29,6	31,6	31,9	33,3	32,6
Linfócitos/μL	2500	1500	2300	1743	2300	2800	2200	2500	1800	2500	2800
Monócitos/μL	300	300	300	470	400	800	500	800	700	400	1100
Granulócitos/μL	4300	3400	3900	3967	5700	4000	1500	4200	2700	4500	4100
Leucócitos/μL	7100	5300	6500	6180	8400	7600	4200	7500	5200	7400	7900
Plaquetas/μL	226000	206000	216000	203000	294000	252000	362000	356000	236000	306000	273000
CD144 ⁺ CD31 ⁺ CD45 ^{dim} CD133 ⁺ /μL	0	0,1	0,1	0,1	0,2	0	0,05	0,1	0,1	0,3	0,25
CD144 ⁺ CD31 ⁺ CD45 ^{dim} CD133 ⁺ /μL	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CD146 ⁺ CD31 ⁺ CD45 ^{dim} CD133 ⁺ /μL	0	0,1	0	0	0,2	0,1	0,05	0,2	0,1	0,23	0,26
CD146 ⁺ CD31 ⁺ CD45 ^{dim} CD133 ⁺ /μL	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
KDR ⁺ CD31 ⁺ CD45 ^{dim} CD133 ⁺ /μL	0	0	0,1	0	0,2	0	0,2	0,2	0,3	0,16	0,34
KDR ⁺ CD31 ⁺ CD45 ^{dim} CD133 ⁺ /μL	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
KDR ⁺ CD34 ⁺ CD45 ^{dim} CD133 ⁺ /μL	0	0	0	0	0	0,1	0,1	0	0	0	0
KDR ⁺ CD34 ⁺ CD45 ^{dim} CD133 ⁺ /μL	0	0	0,1	0,1	0,1	0,1	0	0	0	0	0
KDR ⁺ CD34 ⁺ CD45 ^{dim} CD133 ⁺ /μL	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

TVP aguda - 1ª coleta	TVP- 01	TVP- 02	TVP- 03	TVP- 04	TVP- 05	TVP- 06	TVP- 07	TVP- 08	TVP- 09
Sexo	Masculino	Feminino	Feminino	Feminino	Feminino	Feminino	Masculino	Feminino	Feminino
Origem étnica	Afro-descendente	Afro-descendente	Caucasóide	Caucasóide	Afro-descendente	Afro-descendente	Caucasóide	Caucasóide	Caucasóide
Data de nascimento	29/7/1980	10/9/1953	24/3/1980	1/5/1981	17/12/1958	25/8/1960	9/5/1956	25/10/1980	25/5/1962
Data da coleta	4/12/2007	14/12/2007	30/1/2008	31/1/2008	4/3/2008	1/4/2008	14/4/2008	4/5/2008	14/5/2008
Idade na coleta	27	54	27	26	49	47	51	27	45
Meses entre TVP e coleta	0	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3
Data da TVP	3/12/2007	13/12/2007	29/1/2008	30/1/2008	3/3/2008	28/3/2008	13/4/2008	4/5/2008	14/5/2008
Local da TVP	proximal	distal	proximal	proximal	proximal	proximal	proximal/distal	proximal	proximal
Antecedente pessoal TVP (AP TVP)	não	não	não	não	não	não	sim	não	não
Trombofilia hereditária	não	não	não	FV Leiden	não	NR	não	não	não
Contraceptivo Hormonal (CH)	não	não	não	não	sim	sim	não	não	não
Hipertensão	não	não	não	não	sim	sim	sim	não	não
Diabetes	não	não	não	não	sim	sim	não	não	não
Obesidade	não	não	não	não	não	não	não	sim	não
Anticoagulante oral/ injetável	não	não	sim	sim	sim	não	sim	sim	não
Causa da TVP	espontânea	espontânea	espontânea	FV Leiden	CH	CH	AP TVP	obesidade	espontânea
Hemácias (M/μL)	4,94	4,35	4,7	5,06	5,21	4,66	4,42	3,94	4,52
Hb (g/dL)	10,6	10,8	13	10,9	13,5	9,7	14	11,3	14,1
Ht (%)	36,6	37,1	38,5	35,4	43,3	31,5	40,5	33,3	42,6
VCM (fl)	74,1	85,4	81,7	70	83,1	67,5	91,6	84,5	94,2
HCM (pg)	21,5	24,8	27,7	21,6	25,9	20,9	31,7	28,7	31,2
CHCM (g/dL)	29	29,1	33,9	30,9	31,2	30,9	34,6	33,9	33,1
Linfócitos/μL	2800	1900	1470	1470	2100	2020	1700	2700	NR
Monócitos/μL	600	800	570	310	600	710	600	600	NR
Granulócitos/μL	5400	1100	7750	5310	7000	9040	5400	5800	NR
Leucócitos/μL	8800	13700	9790	7090	9800	11770	7700	9100	7680
Plaquetas/μL	333000	317000	221000	423000	265000	399000	234000	226000	390000
CD144* CD31* CD45 ^{dim} CD133*/μL	35	12	0,3	18	0,1	45	0,3	5,2	2,2
CD144* CD31* CD45 ^{dim} CD133*/μL	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CD146* CD31* CD45 ^{dim} CD133*/μL	34	12	0,3	16	0,3	45	0,3	5	2,1
CD146* CD31* CD45 ^{dim} CD133*/μL	0	0	0	0,1	0	0	0	0	0
KDR* CD31* CD45 ^{dim} CD133*/μL	35	12	0,4	17	0,2	46	0,3	5,4	2,3
KDR* CD31* CD45 ^{dim} CD133*/μL	0	0	0	0	0	0	0	0	0
KDR* CD34* CD45 ^{dim} CD133*/μL	NR	0	0	NR	0	NR	0	0	0
KDR* CD34* CD45 ^{dim} CD133*/μL	NR	0	0	NR	0,1	NR	0	1	1,9
KDR* CD34* CD45 ^{dim} CD133*/μL	NR	0	0	NR	0	NR	0	0	0

TVP aguda 2ª coleta	TVP- 02	TVP- 04	TVP- 05	TVP- 07	TVP- 08	TVP- 09
Sexo	Feminino	Feminino	Feminino	Masculino	Feminino	Feminino
Origem étnica	Afro-descendente	Caucasóide	Afro-descendente	Caucasóide	Caucasóide	Caucasóide
Data de nascimento	10/9/1953	1/5/1981	17/12/1958	9/5/1956	25/10/1980	25/5/1962
Data da coleta	5/3/2009	10/3/2009	17/2/2009	8/4/2009	13/4/2009	19/2/2009
Idade na coleta	55	27	50	52	28	45
Meses entre TVP e coleta	15	13	11	12	11	9
Data da TVP	13/12/2007	30/1/2008	3/3/2008	13/4/2008	4/5/2008	14/5/2008
Local da TVP	distal	proximal	proximal	proximal/distal	proximal	proximal
Antecedente pessoal TVP (AP TVP)	não	não	não	sim	não	não
Trombofilia hereditária	não	FV Leiden	não	não	não	não
Contraceptivo Hormonal (CH)	não	não	sim	não	sim	não
Hipertensão	não	não	sim	sim	não	não
Diabetes	não	não	sim	não	não	não
Obesidade	não	não	não	não	sim	não
Anticoagulante oral/ injetável	não	não	sim	sim	sim	sim
Causa da TVP	espontânea	FVLeiden	CH	AP TVP	CH	espontânea
Hemácias (M/μL)	5,74	4,89	3,97	4,59	4,72	4,77
Hb (g/dL)	15,9	8,2	10,5	14,2	12,9	14,5
Ht (%)	46,9	25,4	32,8	41,2	38,4	42
VCM (fl)	81,6	52	82,5	89,7	81,3	88
HCM (pg)	27,6	16,8	26,5	30,9	27,4	30,5
CHCM (g/dL)	33,8	32,3	32,1	34,5	33,6	34,6
Linfócitos/μL	2120	2400	970	2100	2550	1780
Monócitos/μL	380	300	330	1200	480	350
Granulócitos/μL	4630	2000	5000	2700	5500	4740
Leucócitos/μL	7130	4700	6300	6000	8530	6870
Plaquetas/μL	263000	343000	411000	216000	292000	310000
CD144 ⁺ CD31 ⁺ CD45 ^{dim} CD133 ⁺ /μL	0,3	0,1	0,6	0,3	0,2	0,3
CD144 ⁺ CD31 ⁺ CD45 ^{dim} CD133 ⁺ /μL	0	0	0	0	0	0
CD146 ⁺ CD31 ⁺ CD45 ^{dim} CD133 ⁺ /μL	0,5	0	0,3	0,1	0,5	0,7
CD146 ⁺ CD31 ⁺ CD45 ^{dim} CD133 ⁺ /μL	0	0	0	0	0	0
KDR ⁺ CD31 ⁺ CD45 ^{dim} CD133 ⁺ /μL	0,3	0,1	0,1	0	0,5	0,3
KDR ⁺ CD31 ⁺ CD45 ^{dim} CD133 ⁺ /μL	0	0	0	0	0	0
KDR ⁺ CD34 ⁺ CD45 ^{dim} CD133 ⁺ /μL	0	0	0	0	0	0
KDR ⁺ CD34 ⁺ CD45 ^{dim} CD133 ⁺ /μL	0,1	0	0	0	0,1	0
KDR ⁺ CD34 ⁺ CD45 ^{dim} CD133 ⁺ /μL	0	0	0	0	0	0

TVP crônica	TVP10	TVP11	TVP12	TVP13	TVP14	TVP15	TVP16	TVP17	TVP18	TVP19
Sexo	Feminino	Feminino	Masculino	Feminino	Feminino	Masculino	Masculino	Feminino	Feminino	Masculino
Origem étnica	Caucasóide	Caucasóide	Indígena	Afro-Indígena	Afro-descendente	Caucasóide	Caucasóide	Afro-descendente	Caucasóide	Caucasóide
Data de nascimento	20/11/1974	2/7/1952	25/1/1962	19/4/1966	17/12/1974	3/4/1958	7/10/1979	30/6/1963	11/5/1981	10/5/1959
Data da coleta	16/2/2009	16/3/2009	17/3/2009	25/3/2009	30/3/2009	13/4/2009	31/8/2009	1/10/2009	3/9/2009	3/9/2009
Idade na coleta	34	56	46	43	34	51	29	46	28	50
Meses entre TVP e coleta	12	7	4	7	6	14	22	9	16	36
Data da TVP	2008	10/8/2008	20/11/2008	28/8/2008	set/08	fev/08	17/11/2007	jan/09	mai/08	jun/05
Local da TVP	distal	proximal	proximal	proximal	distal	distal	proximal	distal	distal	distal
Antecedente pessoal TVP (AP TVP)	sim	não	não	não	não	não	não	não	não	não
Antecedente pessoal IAM	não	não	não	não	não	não	não	sim	não	não
Antecedente familiar IAM	não	não	não	não	sim	não	não	não	não	não
Antecedente familiar AVCI	não	não	não	não	não	sim	não	não	não	não
Trombofilia hereditária	não	FV Leiden	não	FV Leiden	não	não	não	não	não	não
Contraceptivo Hormonal (CH)	não	não	não	não	sim	não	não	não	sim	não
Hipertensão	não	sim	não	não	não	sim	não	sim	não	não
Causa da TVP	AP TVP	FV Leiden	espontânea	FV Leiden	CH	espontânea	espontânea	espontânea	CH	espontânea
Hemácias (M/μL)	4,72	4,78	5,37	5,24	5	5,04	5,12	4,33	5,15	5,39
Hb (g/dL)	12,9	11,8	15,7	15,2	12,4	15,3	15,1	8,4	13,1	14,9
Ht (%)	39,2	37,8	47,8	46,1	43,5	43,6	47,9	29,7	42,1	46,9
VCM (fl)	83	79	89	88	87	86,5	93,5	68,7	81,8	87
HCM (pg)	27,4	24,7	29,2	29	24,8	30,4	29,5	19,4	25,4	27,6
CHCM (g/dL)	33,1	31,2	32,8	33	28,5	35,1	31,5	28,3	31,1	31,8
Linfócito/μL	2670	2800	2700	3100	2500	3400	2500	2400	1800	1600
Monócito/μL	680	100	100	200	200	900	500	500	200	400
Granulócito/μL	4260	4700	3000	4900	4400	5700	4600	4200	2000	2600
Leucócitos/μL	7610	7700	5900	8200	7100	10000	7600	7100	4100	4600
Plaquetas/μL	322000	452000	267000	271000	272000	282000	382000	309000	294000	312000
CD144 ⁺ CD31 ⁺ CD45 ^{dim} CD133 ⁺ /μL	0,4	0,2	0,1	0	0,1	0,2	0,1	0,3	0,1	0
CD144 ⁺ CD31 ⁺ CD45 ^{dim} CD133 ⁺ /μL	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CD146 ⁺ CD31 ⁺ CD45 ^{dim} CD133 ⁺ /μL	0,5	0,2	0,2	0,2	0,1	0,1	0,2	0,3	0,2	0,1
CD146 ⁺ CD31 ⁺ CD45 ^{dim} CD133 ⁺ /μL	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
KDR ⁺ CD31 ⁺ CD45 ^{dim} CD133 ⁺ /μL	0,3	0,5	0,2	0	0,1	0,1	0,3	0,2	0,1	0,05
KDR ⁺ CD31 ⁺ CD45 ^{dim} CD133 ⁺ /μL	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
KDR ⁺ CD34 ⁺ CD45 ^{dim} CD133 ⁺ /μL	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
KDR ⁺ CD34 ⁺ CD45 ^{dim} CD133 ⁺ /μL	0,1	0	0,1	0	0	0	0	0	0,1	0
KDR ⁺ CD34 ⁺ CD45 ^{dim} CD133 ⁺ /μL	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0