

UNIVERSIDADE DA BEIRA INTERIOR

**AVALIAÇÃO DAS CÉLULAS ENDOTELIAIS EM
PATOLOGIAS QUE COMPROMETEM A
INTEGRIDADE DO ENDOTÉLIO**

Autor: Cláudia Torres

Orientadores: Professora Dra. Mafalda Fonseca
Dra. Sara Morais

**PROJECTO REALIZADO NO SERVIÇO DE HEMATOLOGIA
CLÍNICA DO HOSPITAL DE SANTO ANTÓNIO- PORTO
LABORATÓRIO DE CITOMETRIA DE FLUXO**

O conteúdo desta tese é da responsabilidade exclusiva da autora.

(Cláudia Angelina Borges Torres)

(Julho de 2010)

**DISSERTAÇÃO APRESENTADA À
UNIVERSIDADE DA BEIRA INTERIOR
PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE
MESTRE EM BIOQUÍMICA**

AGRADECIMENTOS

A realização deste trabalho não seria possível sem a contribuição de várias pessoas:

À Professora Doutora Margarida Lima por me ter dado a possibilidade de realizar este projecto. Pelo apoio e compreensão incondicionais. Por me ter dado a oportunidade de descobrir de que é possível trabalhar no que gostamos.

Ao Doutor Manuel Campos, por ter permitido a realização este projecto. Por toda a simpatia, generosidade e apoio.

À Doutora Sara Morais, pela simpatia, incentivo e apoio.

Ao Fórum Hematológico do Norte por ter permitido a realização deste projecto

Ao Hospital Geral de Santo António por ter autorizado a realização deste projecto.

À Professora Doutora Mafalda Fonseca pela ajuda e incentivo.

Ao Dr. Jorge Candeias por toda a compreensão e por partilhar comigo o seu vasto conhecimento.

Ao Alexandre Salvador pelas recomendações e por todo o apoio.

À Carla Carvalho pela ajuda.

À Dra. Bárbara Guerra pela generosidade, por toda a simpatia e pelas palavras amigas.

A todas as pessoas do Laboratório de Citometria de Fluxo do HGSA por me terem ensinado tanto. Por terem estado sempre ao meu lado, por todo o apoio, pela infinita paciência e simpatia.

Às enfermeiras responsáveis pela colheita das amostras e pela boa disposição.

A todos os voluntários que contribuíram para a realização deste trabalho, pela disponibilidade e simpatia.

INDICE

	Pág.
Índice de Figuras	xii
Índice de Tabelas	xiv
Abreviaturas	xvii
Resumo	xxi
Abstract	xxiii
1. Introdução Teórica	2
1.1 Células endoteliais	2
1.2 Origem e desenvolvimento das células endoteliais	2
1.3 Função das células endoteliais	3
1.4 Hemostase	4
1.4.1 Vasoconstrição localizada	4
1.4.2 Hemostase primária	5
1.4.3 Hemostase secundária	6
1.5 Regulação da hemostase pelas células endoteliais	8
1.6 Moléculas das células endoteliais	8
1.6.1 Factores anti-plaqueta	9
1.6.2 Factores anticoagulantes	10
1.6.3 Factores fibrinolíticos	10
1.7 Lesão do endotélio e a trombose	12

1.8 Análises de monitorização do endotélio	12
1.9 Células endoteliais circulantes	13
1.10 Quantificação e identificação das CECs	14
1.11 Evidencias do potencial das CECs como marcador de prognóstico e monitorização da integridade vascular	18
1.12 Tromboembolismo venoso	20
1.13 Síndromes Mieloproliferativas Crónicas	22
1.14 Leucemia Linfocítica Crónica B	24
2. Hipótese	26
3. Objectivos	28
4. Material e Métodos	30
4.1 Selecção da amostra	30
4.1.1 Grupo Controlo	30
4.1.2 Grupo de doentes com TEV	30
4.1.3 Grupo de doentes com Síndrome Mieloproliferativo – TE e TV	31
4.1.4 Grupo de Doentes LLC-B	31
4.2 Colheitas das amostras de sangue	34
4.3 Contagem Hematologica	35
4.4. Citometria de fluxo	35
4.5 Quantificação das CEC	37
4.6 Processamento das amostras	37

4.7 Aquisição	38
4.8 Análise	42
4.9 Ensaio preliminares	43
4.10 Análise estatística	45
5. Resultados	47
5.1 Ensaio preliminares	47
5.2 Caracterização dos diferentes grupos em estudo	48
5.3 Quantificação das CEC	50
5.4 Quantificação das CEP	50
5.5 Correlação entre o número de CEC e o número de leucócitos	51
5.6 Correlação entre o número de CEC e o número de linfócitos	52
5.7 Correlação entre o número de CEC e o número de plaquetas	52
5.8 Quantificação de CEC CD61+ e a sua correlação com o nº de plaquetas e com o nº total de CEC nos doentes com TE e PV	53
5.9 Relação do número de CEC com a idade	54
5.10 Quantificação de CEC positivas para CD54, CD62E, CD106 e CD142	55
5.11 Quantificação de CEC CD36+	56
5.12 Correlação entre o número de CEC (total e subpopulações) e os dados clínicos e analíticos dos doentes com TEV.	56
6. Discussão	59
7. Conclusão	70
8. Perspectivas futuras	73

9. Bibliografia	75
10. Cibergrafia	88
Anexo	89
Consentimento Informado para Controlos	90
Consentimento Informado para doentes	912
Informação ao Participante	92
Formulário para registo de dados clínicos	93

INDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1.1 – Localização das células endoteliais nos vasos sanguíneos	2
Figura 1.2 – Shear- stress	4
Figura 1.3 – Adesão das plaquetas ao subendotélio	6
Figura 1.4 - A cascata de coagulação	7
Figura 1.5 - Expressão dos antígenos nas células endoteliais, micropartículas endoteliais, células endoteliais progenitoras, plaquetas e células hematopoiéticas	17
Figura 4.1 – Voltagens definidas para a aquisição das amostras	39
Figura 4.2 – “Dot plot” FSC/SSC com região R7 para excluir células mortas e detritos	40
Figura 4.3 – “Dot plot” FSC/SSC com região R1, para incluir as esferas, e com região R5 na zona das células mononucleares	40
Figura 4.4 – “Dot plot” FL1/FL2 com região R6 para contabilizar as esferas adquiridas pelo citómetro de fluxo	41
Figura 4.5 – “Dot plot” FL3/FL2 com região R8 para aquisição dos eventos CD146+	42
Figura 4.6. – Imagem que demonstra a selecção das CEC CD146+CD45-	43
Figura 4.7. – Eventos identificados a azul representam as CEP CD146+CD133+CD45 ^{low}	43
Figura 5.1 – Número de eventos de CEC obtidos pelo procedimento 1 e pelo procedimento 2	47
Figura 5.2 – Número de CEC nos diferentes grupos dos doentes e no grupo controlo. Os resultados estão expressos em mediana	50
Figura 5.3 – Número de CEP nos diferentes grupos dos doentes e no grupo controlo.	51
Figura 5.4- Número de CEC CD61+ e número total de CEC no grupo com TE e no grupo com PV.	53

INDICE DE TABELAS

	Pág.
Tabela 1.1 – Principais funções das moléculas envolvidas no equilíbrio hemostático e que são produzidas pelas células endoteliais	11
Tabela 1.2 – Antígenos encontrados na superfície das células endoteliais	16
Tabela 1.3 – Patologias onde foi observado um aumento no número de CEC	18
Tabela 4.1. Dados demográficos dos Controlos	32
Tabela 4.2 Dados demográficos dos TEV	33
Tabela 4.3 Dados demográficos dos TE	33
Tabela 4.4 Dados demográficos dos PV	34
Tabela 4.5 Dados demográficos dos LLC-B	34
Tabela 4.6 Características dos anticorpos usados para identificação das CEC	35
Tabela 4.7 Anticorpos usados para caracterização das CEC	36
Tabela 4.8 Anticorpo adicional usado para melhor caracterização das CEC nos doentes TE e PV	36
Tabela 4.9 Painel de anticorpos usado para estudo das CEC	37
Tabela 4.10 Volumes usados dos diferentes anticorpos	38
Tabela 5.1 - Dados demográficos das amostras usadas na primeira fase do estudo	47
Tabela 5.2 – Características gerais dos grupos que participaram no estudo	48
Tabela 5.3- Dados clínicos e analíticos dos doentes com TEV	49
Tabela 5.4 – Correlação entre o nº de CEC e o nº de leucócitos	52
Tabela 5.5 – Correlação entre o nº de CEC e o nº de linfócitos	52

Tabela 5.6 – Correlação entre o nº de CEC e o nº de plaquetas	53
Tabela 5.7 – Correlação entre o nº de CEC CD61+ e o nº total de CEC e entre o nº de CEC CD61+ e o nº de plaquetas no grupo com TE e no grupo com PV	54
Tabela 5.8 – Correlação entre o nº de CEC e a idade	54
Tabela 5.9 – Número de CEC CD54+, CEC CD62E+, CEC CD106+ e CEC CD142+ em todos os grupos que participaram no estudo	55
Tabela 5.10 – Número de CEC CD36+ em todos os grupos que participaram no estudo	56
Tabela 5.11 – Correlação entre o número de CEC, tanto o número total CEC como as suas diferentes subpopulações, e os dados clínicos e analíticos dos doentes com TEV	57

ABREVIATURAS

Abreviatura	Significado
ADP	Adenosina difosfato
AMP	Adenosina monofosfato
APC	Aloficocianina, do inglês <i>Allophycocyanin</i>
ATP	Adenosina trifosfato
CD	Do inglês <i>Cluster of differentiation</i>
CE	Células endoteliais
CEC	Células endoteliais circulantes
CEP	Células endoteliais progenitoras
CMV	Citomegalovírus
Ecto-ADPase	Do inglês <i>Ecto-adenosine diphosphatase</i>
EDTA	Ácido etilenediamino tetra-acético
FITC	Isocianato de fluoresceína, do inglês <i>Fluorescein isothiocyanate</i>
FII	Factor II
FIIa	Factor II ativado
FT	Factor tecidual
FV	Factor V
FVa	Factor V ativado
FVII	Factor VII

FVIIIa	Factor VIII ativado
FvW	Factor de von Willebrand
FX	Factor X
FXII	Factor XII
FXIII	Factor XIII
GP	Glicoproteína
GPIb	Glicoproteína Ib
GPIIb-IIIa	Glicoproteína IIb-IIIa
ICAM-1	Do inglês, <i>Vascular cell adhesion molecule 1</i>
IL-1	Interleucina 1
KDR	Do inglês <i>Kinase insert domain receptor (VEGFR2)</i>
LLC-B	Leucemia Linfocítica Crônica B
m²	Metro quadrado
mL	Mililitro
µm	Micrómetro
MP	Micropartículas
Nº	Número
ON	Óxido nítrico
PAI-1	Inibidor do ativador de plasminogenio 1, do inglês <i>Plasminogen activator inhibitor 1</i>
PBS	Solução tampão de fosfato do inglês, <i>Phosphate buffer solution</i>

PE	Ficoeritrina, do inglês <i>Phycoerythrin</i>
PECAM-1	Do inglês, <i>Platelet endothelium cell adhesion molecule 1</i>
PerCP	Complexo proteína clorofil-peridina, do inglês <i>Peridin – chlorophyll-protein complex</i>
PDGF	Factor de crescimento derivado das plaquetas, do inglês <i>Platelet derived growth factor</i>
PGI2	Prostaciclina
PT	Protrombina
PTT	Trombocitopénica Púrpura Trombótica, do inglês <i>Thrombotic thrombocytopenic purpura</i>
PV	Policitémia Vera
SPSS	Do inglês <i>Statistical Package for Social Sciences</i>
TA	Trombose Arterial
TE	Trombocitémia Essencial
TEV	Tromboembolismo Venoso
TFPI	Inibidor da via do factor tecidual, do inglês <i>Tissue factor pathway inhibitor</i>
TNF-α	Do inglês <i>Tumor necrosis factor α</i>
tPA	Activador do plasminogenio tecidual, do inglês <i>Tissue – plasminogen activator</i>
VCAM-1	Do inglês, <i>Intracellular cell adhesion molecule</i>
VE	Endotélio vascular, do inglês <i>Vascular endothelium</i>
VEGFR-2	Do inglês <i>Vascular endothelial growth factor receptor 2</i>

RESUMO

As células endoteliais estão localizadas na interface entre o tecido vascular e o sangue, revestindo em monocamada toda a árvore vascular. Estas células são responsáveis pela presença de uma superfície vascular anti-coagulante, no entanto, quando ocorre lesão do endotélio podem providenciar uma superfície pró-trombótica. Suspeita-se que as células endoteliais em circulação no sangue periférico (células endoteliais circulantes, CEC) têm um elevado potencial como marcador clínico da integridade vascular e dos processos pró-trombóticos.

Para estudar este possível potencial, quantificou-se as CEC por citometria de fluxo em quatro grupos de doentes (TEV - tromboembolismo venoso, TE - trombocitemia essencial, PV - policitemia vera e LLC-B – leucemia linfocítica crónica B) e comparou-se com o grupo controlo. Também se estudou nas CEC de todos os grupos a expressão de três marcadores de activação, o CD54 (ICAM-1, Intercellular Adhesion Molecule 1), o CD62E (Selectina E), e o CD106 (VCAM-1, Vascular Cell Adhesion Molecule 1), de um marcador de actividade pró-coagulante, o CD142 (Factor Tecidual) e do marcador de origem microvascular, o CD36. Por último, no grupo com TEV, avaliou-se se a expressão dos marcadores de activação e de actividade pró-coagulante se correlacionava com os dados clínicos e analíticos dos doentes.

Observou-se um aumento estatisticamente significativo do nº de CEC em todos os grupos de doentes comparativamente ao grupo controlo. Nos quatro grupos de doentes houve um maior nº de CEC CD36+ do que no grupo controlo. Relativamente à expressão dos marcadores de activação e de actividade pró-coagulante, todos os grupos de doentes tiveram um maior nº de CEC CD62E+, mas apenas o grupo de doentes com TEV apresentava um maior nº de CEC CD54+ e CD142+ com diferenças estatisticamente significativas relativamente ao grupo controlo. Nos doentes com TEV verificou-se que o nº de CEC CD142+ se correlacionava com o nº de tromboes e que o nº de CEC CD54+ se correlacionava com a concentração de fibrinogénio.

Este estudo sugere que as CEC, além de revelarem a existência de lesão endotelial, também podem indicar a presença de activação endotelial e de actividade pró-coagulante, sendo possível que estejam envolvidas na etiopatogenia das tromboes.

ABSTRACT

Endothelial cells are located at the interface between the vascular tissue and blood, in monolayer coating the entire vascular tree. These cells are responsible for the presence of a vascular anti-coagulant surface, however, when occurs endothelial injury they may provide a pro-thrombotic surface. It is suspected that endothelial cells in peripheral blood (circulating endothelial cells, CEC) have considerable potential as a clinical marker of vascular integrity and prothrombotic processes.

To study this potential, we quantified the CEC by flow cytometry in four groups of patients (VTE - venous thromboembolism, ET - essential thrombocythaemia, PV - polycythemia vera and B-CLL – B chronic lymphocytic leukemia) and compared with the control group. We have also studied the expression of three activation markers - CD54 (ICAM-1, Intercellular Adhesion Molecule 1), CD62E (E selectin) and CD106 (VCAM-1, Vascular Cell Adhesion Molecule 1) - one pro-coagulation marker - CD142 (Tissue Factor) – one microvascular origin marker - CD36 - on CEC. Finally it was determined whether the expression of activation and pro-coagulation markers correlates with the clinical and laboratory data of patients with VTE.

There was a statistically significant increase in the number of CEC in all patient groups compared with the control group. In the four patient groups there was a higher number of CD36+ CEC than in the control group. Relatively to the expression of activation and pro-coagulation markers, all groups of patients had a higher number of CD62E+ CEC, but only the group of patients with VTE had a higher number of CD54+ CEC and CD142+ CEC, with statistically significant differences in comparison to control group. We also found that the number of CD142+ CEC correlated with the number of thrombosis and that the number of CD54+ CEC correlated with the concentration of fibrinogen in patients with VTE.

This study suggests that the CEC reveal endothelial injury and may also indicate the presence of endothelial activation and pro-coagulant activity. It is possible that the CEC are involved in the mechanism associated with the development of thrombosis.

1. INTRODUÇÃO

1.1 CÉLULAS ENDOTELIAIS

O endotélio está localizado na interface entre o tecido e o sangue (Wu *et al*, 1996) É formado pelas células endoteliais (CE) que revestem toda a árvore vascular (figura 1.1). O número de CE num indivíduo adulto é de aproximadamente 1 a 6 x 10¹³ células, pesando cerca de 1 Kg e corresponde a uma área de 1 a 7 m² (Cines *et al*, 1998).

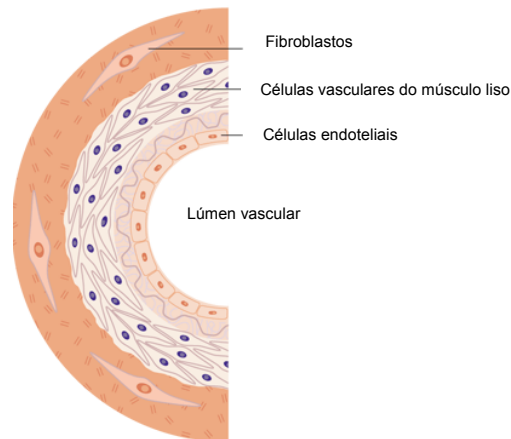


Figura 1.1 – Localização das células endoteliais nos vasos sanguíneos (adaptado de http://www.invitrogen.com/site/us/en/home/Products-and-Services/Applications/CellCulture/primary_cell_culture/PCC-Misc/vascular-biology.html)

1.2 ORIGEM E DESENVOLVIMENTO DAS CÉLULAS ENDOTELIAIS

Do ponto de vista do desenvolvimento, o endotélio origina-se a partir da mesoderme pela via de diferenciação dos hemangioblastos e/ou angioblastos (Aird, 2007a).

Durante a embriogênese, as células da mesoderme formam agregados que dão origem à formação das ilhotas sanguíneas no interior do saco vitelino primitivo. Estas ilhotas são constituídas por uma camada interna, que tem as células estaminais hematopoiéticas, e uma camada externa constituída por angioblastos (Loges *et al*, 2004; Cines *et al*, 1998). A camada interna dá origem às células do sangue, e a camada externa origina as CE (Loges *et al*, 2004; Cines *et al*, 1998)

O aparecimento simultâneo das linhagens hematopoiética e endotelial nas ilhotas sanguíneas, levou à formulação da hipótese de que elas provêm de um precursor comum, designado de hemangioblasto (Loges *et al*, 2004).

A formação das ilhotas sanguíneas marca o início da vascularização no embrião em desenvolvimento (Loges *et al*, 2004). Dois processos diferentes contribuem para a

geração do sistema vascular. O primeiro processo, a vasculogénese, consiste na diferenciação das CE a partir dos hemangioblastos e a sua posterior organização (Risau *et al*, 1988). O segundo processo, a angiogénese resulta da formação de novos vasos por expansão dos vasos sanguíneos pré-existentes (Folkman e Shing, 1992).

A diferenciação das CE a partir dos hemangioblastos ou angioblastos há muito que é considerada um processo restrito à fase inicial da embriogénese, enquanto a angiogénese ocorre durante o desenvolvimento pós-natal e durante a vida (Loges *et al*, 2004). No entanto, descobertas recentes indicam a existência de uma população de células CD34+ na medula óssea e sangue periférico de indivíduos adultos, designadas de células progenitoras endoteliais, que têm a capacidade de se diferenciarem em CE (Shi *et al*, 1998; Lin *et al*, 1999) e contribuir para a revascularização *in vivo* (Gehling *et al*, 2000).

1.3 FUNÇÃO DAS CÉLULAS ENDOTELIAIS

O endotélio desempenha inúmeras funções fisiológicas. Isto acontece porque as CE estão estrategicamente localizadas entre o sangue e os tecidos, e devido às junções específicas das proteínas e dos receptores que regulam as interacções célula-célula e célula-matriz (Aird, 2007a; Cines *et al*, 1998). A presença de receptores da membrana celular também contribui para as funções desempenhadas pelas CE, controlando numerosas moléculas incluindo proteínas, partículas transportadoras de lípidos, metabolitos e hormonas (Cines *et al*, 1998).

Estas características permitem às CE desempenhar diferentes funções como a manutenção do tónus vascular, activação e inactivação de hormonas vasoactivas, tráfego das células do sangue e transporte de nutrientes e solutos (Wu e Thiagarajan, 1996; Aird, 2007a). As CE também são essenciais para proteger da lesão vascular e manter a fluidez do sangue, controlando o equilíbrio hemostático (Cines *et al*, 1998).

O sistema hemostático apresenta um equilíbrio delicado entre as características pro-coagulantes e anticoagulantes (Aird, 2007b; Franchini, 2006). Sob condições normais as CE encontraram-se em “repouso”, não no sentido que estejam inertes, mas sim metabolicamente activas, providenciando uma superfície activa anticoagulante que facilita a passagem do plasma e dos constituintes celulares em todo o sistema vascular, mantendo o estado fluído do sangue (Aird, 2007a; Cines *et al*, 1998). Alterações que conduzam à lesão do endotélio, tais como aquelas que podem ocorrer

em locais de inflamação ou por elevado “shear-stress” hidrodinâmico (figura 1.2), alteram a actividade anticoagulante e induzem as CE a criar um microambiente pró-trombótico e antifibrinolítico (Cines *et al*, 1998).

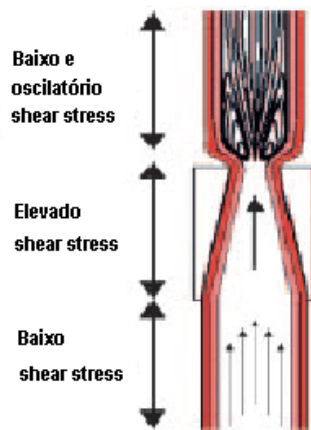


Figura 1.2 – Shear-stress. O “shear-stress” é um termo aplicado à força mecânica que o fluxo de sangue pode exercer nas paredes dos vasos sanguíneos provocando o arraste das células endoteliais e consequente exposição do subendotélio. (adaptado de Cheng *et al*, 2005)

1.4 HEMOSTASE

A hemostase é um dos mecanismos de defesa do organismo por preservar a integridade da circulação e limitar a perda de sangue (Golan *et al*, 2007). Este mecanismo resulta de uma sequência de reacções locais que culmina no controlo da hemorragia, a partir de um vaso lesado (Franchini, 2006) e depende de interacções complexas entre a parede dos vasos, as plaquetas, os processos de coagulação e a fibrinólise. Por isto, a hemostase é regulada por diferentes processos e inclui várias fases:

1. Vasoconstrição localizada
2. Hemostase primária (formação do tampão plaquetário)
3. Hemostase secundária (formação do coágulo de fibrina)

1.4.1 Vasoconstrição localizada

A vasoconstrição ocorre imediatamente após a lesão vascular sendo mediada por um reflexo neurogénico ainda pouco compreendido, e pela libertação de vasoconstritores derivados do endotélio, como a endotelina (Golan *et al*, 2007).

1.4.2 Hemostase primária

Imediatamente após a vasoconstrição, ocorre a hemostase primária que tem como objectivo formar um tampão primário de plaquetas que rapidamente estabiliza a lesão vascular. Durante esta fase, as plaquetas são activadas e aderem à matriz exposta do subendotélio. As glicoproteínas da membrana das plaquetas são os principais receptores de activação plaquetária (Golan *et al*, 2007).

A adesão das plaquetas ao colagénio subendotelial exposto após lesão vascular é intercedida pelo factor de von Willebrand (FvW), uma proteína multimérica, que é libertada pelas plaquetas activadas e pelas CE do local lesado. O FvW liga-se aos receptores de superfície na membrana das plaquetas (nomeadamente à glicoproteína Ib [GPIb]) e ao colagénio exposto, estabelecendo uma “ponte” que medeia a adesão das plaquetas ao colagénio (figura 1.3) (Golan *et al*, 2007).

Após adesão das plaquetas, estas são activadas libertando o conteúdo dos seus grânulos (Golan *et al*, 2007). As plaquetas têm dois tipos de grânulos, os grânulos α e os grânulos densos. Os primeiros contêm fibrinogénio, fibronectina, factor V, FvW, factor plaquetário 4 e factor de crescimento derivado das plaquetas (PDGF). Os grânulos densos têm ADP (adenosina difosfato) e ATP (adenosina trifosfato), cálcio ionizado, histamina, serotonina e epinefrina (Triplet, 2000).

Algumas das substâncias libertadas pelos grânulos vão activar determinadas enzimas que são responsáveis pela formação do tromboxano A₂ (Triplet, 2000). Este, além de causar vasoconstrição no local lesado, estimula ainda mais a libertação do conteúdo dos grânulos, prolongando a activação das plaquetas. O tromboxano A₂, juntamente com o ADP, activa outras plaquetas, aumentando a expressão da GPIIb-IIIa. Com a ligação do fibrinogénio a esta glicoproteína vai ocorrer a agregação das plaquetas e consequentemente formação de um tampão hemostático primário (figura 1.3) (Golan *et al*, 2007).

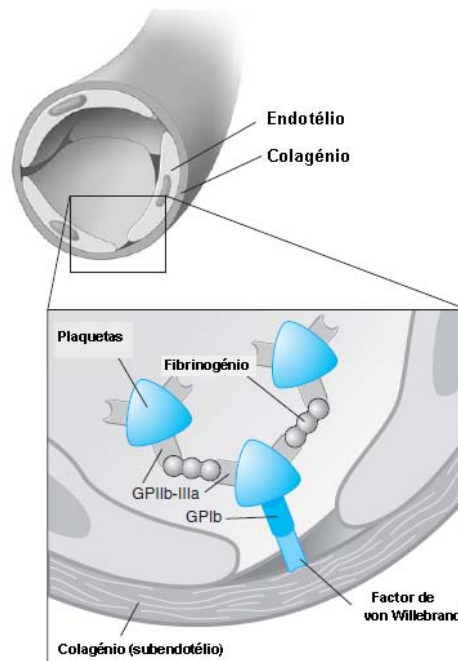


Figura 1.3 – Adesão das plaquetas ao subendotélio. O factor de von Willebrand medeia a adesão das plaquetas ao subendotélio, por se ligar à glicoproteína GPIb da membrana das plaquetas e ao colagénio do subendotélio. Durante a agregação das plaquetas, o fibrinogénio liga-se a outra glicoproteína existente na superfície das plaquetas, a GPIIb-IIIa (Adaptado de Golan *et al*, 2007).

1.4.3 Hemostase secundária

A hemostase secundária é também designada por cascata de coagulação. Esta ocorre quase em simultâneo com a formação do tampão hemostático primário e provoca a conversão do fibrinogénio em fibrina, por acção de uma enzima designada de trombina, originando um coágulo estável (Golan *et al*, 2007; Triplet, 2000).

A cascata de coagulação consiste numa sequência de eventos enzimáticos, que envolvem uma série de proteínas – também designadas de factores de coagulação. Estes são normalmente identificados por algarismos romanos e para indicar a sua forma activa acrescenta-se a letra “a” após o algarismo (Triplet, 2000; Rogers, 1988). A maior parte dos factores de coagulação são sintetizados no fígado, e circulam na forma inactiva de proenzimas (Golan *et al*, 2007). Estas proenzimas são clivadas proteoliticamente e activadas pelos factores de activação que as precedem na cascata (Golan *et al*, 2007).

No passado, alguns autores sugeriram que a cascata de coagulação poderia ocorrer segundo duas vias, a via extrínseca, ou via do factor tecidual (FT) e em via intrínseca, ou via de activação por contacto. Agora sabe-se que a coagulação é normalmente

iniciada pela via extrínseca, mas que é consideravelmente amplificada por elementos da via intrínseca (figura 1.4) (actualmente designada de via da amplificação), convergindo ambas para uma via comum (Fauci *et al*, 2008; Golan *et al*, 2007; Monroe *et al*, 2002).

A via extrínseca é iniciada pelo FT, uma lipoproteína expressa por leucócitos activados, células endoteliais, células do músculo liso subendoteliais e por fibroblastos subendoteliais no local da lesão vascular, enquanto a via intrínseca é activada pelo factor XII (FXII, factor de Hageman) (Golan *et al*, 2007). Apesar destas duas vias convergirem para activar o factor X, existem muitas interligações entre elas. Por exemplo, o factor VII (é activado pela via extrínseca) pode activar proteoliticamente o factor IX (o factor da via intrínseca). Tanto a via intrínseca como a extrínseca levam à activação do factor X. Numa reacção importante, que requer o factor V, o factor X activado cliva a protrombina (PT, factor II) a trombina (factor IIa). A principal acção da trombina é a conversão do fibrinogénio (factor I) em monómeros de fibrina, que ao interligarem com o factor XIIIa, formam polímeros insolúveis e conseqüentemente um coágulo muito estável (Golan *et al*, 2007).

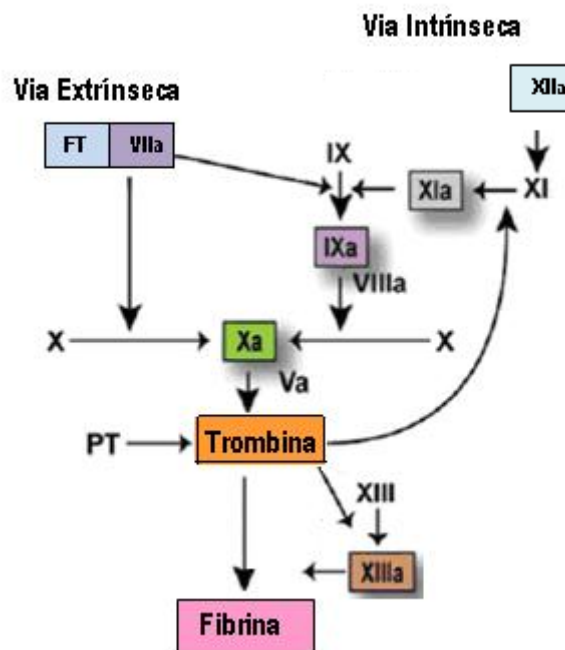


Figura 1.4 - A cascata de coagulação. O FT ao entrar em contacto com o factor VII promove a sua activação formando-se o complexo FT:FVIIa. Este activa o FX e FIX. Alternativamente, o FXI pode activar FIXa. O complexo protrombinase (FVa:FXa) activa a protrombina (PT) convertendo-a em trombina. Por sua vez a trombina cliva o fibrinogénio em monómeros solúveis, que depois fazem ligação cruzada com o FXIIIa, formando-se a fibrina (Adaptado de Mackman 2004).

A trombina é uma enzima multifuncional que actua em diversos processos importantes da cascata de coagulação:

- (1) Activa fortemente as plaquetas, amplificando a libertação dos grânulos e agregação das plaquetas;
- (2) Converte a proteína de fibrinogénio plasmática solúvel em fibrina, formando-se longas fibras insolúveis;
- (3) Activa o factor XIII, que faz ligação cruzada com a fibrina originando um coágulo muito estável.

Para além das suas propriedades pró-coagulantes, a trombina actua na modulação das respostas da coagulação. Liga-se a receptores de trombina das CE vasculares, adjacentes à área da lesão vascular, estimulando nestas a libertação de inibidores de plaquetas e de proteínas pró-fibrinolíticas (Golan *et al*, 2007).

1.5. REGULAÇÃO DA HEMOSTASE PELAS CÉLULAS ENDOTELIAIS

A regulação da hemostase ocorre principalmente por dois motivos. Em primeiro lugar a hemostase deve ser restrita ao local onde ocorreu a lesão endotelial. Ou seja, a activação das plaquetas e dos factores de coagulação no plasma, deverá ocorrer apenas no local da lesão endotelial e da expressão do FT. Em segundo lugar, o tamanho do coágulo deve ser limitado ao local da lesão vascular, de forma que o lúmen vascular permaneça desobstruído (Golan *et al*, 2007).

Após a lesão vascular, as CE intactas no local da lesão tornam-se imediatamente activadas, apresentando um conjunto de factores pró-coagulantes, que promovem a hemostase, e factores anti-coagulantes que restringem a propagação do coágulo para além do local lesado. Os factores de pró-coagulação, como o FT, encontram-se ligados à membrana do local lesado – estes factores providenciam uma superfície na qual a cascata de coagulação pode ser iniciada. Em oposição, os factores anti-coagulantes são geralmente libertados para o sangue. Assim as CE mantêm o equilíbrio entre os factores pró-coagulantes e anti-coagulantes (Golan *et al*, 2007; Wu e Thiagarajan, 1996).

1.6 MOLÉCULAS DAS CÉLULAS ENDOTELIAIS

Devido aos crescentes sucessos laboratoriais a nível das culturas de células foi possível identificar e caracterizar as moléculas que as CE produzem e que são as

responsáveis pelas funções pró-coagulantes e anticoagulantes (Wu e Thiagarajan, 1996; Cines *et al*, 1998). Alguns estudos referem moléculas que desencadeiam a transformação da superfície pró-coagulante e que não são detectados no endotélio normal não lesado, nomeadamente o FT e o factor de von Willebrand (FvW). No entanto, existem outras moléculas que contribuem para a tromborresistência e vasoprotecção. Destas, algumas são constantemente libertadas e outras são produzidas apenas em resposta a um estímulo.

As moléculas que suprimem a activação das plaquetas e a sua interacção com as paredes dos vasos são a prostaciclina (PGI₂), o óxido nítrico (ON) e a difosfatase-ecto adenosina (ADPase). Enquanto as moléculas envolvidas no controlo da coagulação, são a trombomodulina; moléculas tipo heparina; a proteína C; a proteína S e o inibidor da via do factor tecidual (TFPI). Também existem moléculas, como o activador tecidual de plasminogénio (tPA) que promovem a fibrinólise, que é um processo pelo qual a fibrina é dissolvida (Wu e Thiagarajan, 1996; Aird, 2007a).

1.6.1 Factores anti-plaqueta

Prostaciclina (PGI₂) - É uma molécula multifuncional, libertada pelas CE. É um potente inibidor da activação e agregação plaquetária. Induz o relaxamento das células do músculo liso vascular (Moncada, 1982; Golan *et al*, 2007).

Oxido Nítrico (ON) - É um mediador de vasodilatação, imunomodulação, citotoxicidade e de neurotransmissão (Moncada, 1999). É um inibidor da activação das plaquetas. O ON e a prostaciclina actuam sinergeticamente, não apenas na inibição da adesão e agregação das plaquetas, mas também revertendo a agregação das plaquetas (Radomski *et al*, 1987). A inibição sinérgica da activação das plaquetas por estas duas moléculas é de extrema importância para a manutenção da fluidez do sangue e controlo da formação do coágulo (Cines *et al*, 1998; Wu e Thiagarajan, 1996).

Ecto-ADPase - A superfície das CE possui actividade enzimática que degrada a adenosina difosfato (ADP) em adenosina monofosfato (AMP). Esta enzima foi designada de ecto-ADPase (Wu e Thiagarajan, 1996). Como o ADP libertado pelas plaquetas activadas é um importante mediador para o recrutamento e amplificação da agregação das plaquetas, a ecto-ADPase poderá desempenhar um papel fisiológico, limitando a extensão dessa agregação (Marcus *et al*, 1990).

1.6.2 Factores anticoagulantes

Trombomodulina - A trombomodulina está presente em todas as CE. Esta glicoproteína funciona como receptor para a trombina formando o complexo trombina-trombomodulina. Esse complexo rapidamente activa a proteína C, que é um anticoagulante natural sintetizado no fígado (Esmon, 1989). A proteína C activada, na presença da proteína S, inactiva os factores Va e VIIIa, controlando dessa forma, a activação do mecanismo de coagulação. A trombomodulina ao ligar-se à trombina, inibe a sua actividade pró-coagulante, como a coagulação do fibrinogénio, activação dos factores V e XIII e a agregação das plaquetas (Thompson e Salem, 1986).

Proteína S - A proteína S é uma glicoproteína dependente de vitamina K que aumenta a inactivação do factor Va por se ligar à proteína C formando um complexo. A proteína S é sintetizada pelas CE, fígado e megacariócitos (Dahlback, 1984).

Moléculas do tipo heparina – São proteoglicanos sulfatados com actividade anticoagulante que têm a função de cofactor para a antitrombina. A antitrombina, que é sintetizada no fígado, é o principal inibidor das proteases de serina presentes no plasma. Forma um complexo estequiométrico de 1:1 com a trombina e outras proteases de serina, como o factor Xa, IXa, e XIIa. Devido à formação do complexo antitrombina-trombina ocorrer a ritmo relativamente baixo, a presença de moléculas tipo heparina acelera consideravelmente esta interacção (Fukudome e Esmon, 1995; Wu e Thiagarajan, 1996).

Inibidor da via do Factor tecidual (TFPI) - Como o seu nome indica, limita as acções do FT. O complexo factor VIIa/FT é inibido pelo TFPI na presença do factor Xa (Baugh *et al*, 1998). O TFPI é sintetizado no fígado e pelas CE. A concentração de TFPI é normal em doenças hepáticas graves, mas há diminuição na coagulação intravascular disseminada, sugerindo que as CE poderão ser a principal fonte de TFPI (Haskel *et al*, 1991).

1.6.3 Factores fibrinolíticos

Activador do plasminogénio tecidual (tPA) - É sintetizado pelas CE, e em presença de fibrina converte o plasminogénio, uma proteína sintetizada no fígado, em plasmina. A plasmina exerce um efeito anticoagulante por clivar proteoliticamente a fibrina convertendo-a em produtos de degradação, e assim dissolvendo o coágulo

anteriormente formado. No entanto a actividade do tPA pode ser inibida pelo inibidor do activador de plasminogénio 1 (PAI-1), que também é sintetizado pelas CE. Quando as concentrações de trombina e de citocinas inflamatórias (como a IL-1 e TNF- α) são elevadas, as CE aumentam a libertação de PAI-1, impedindo o tPA de activar a plasmina. Isto garante a formação de um coágulo estável de fibrina no local da lesão vascular (Wu e Thiagarajan 1996).

No quadro seguinte são descritas resumidamente as principais moléculas sintetizadas pelas CE e a sua acção no estabelecimento da hemostase.

Tabela 1.1 – Principais funções das moléculas envolvidas no equilíbrio hemostático e que são produzidas pelas células endoteliais (adaptado de Wu e Thiagarajan, 1996]

Mediadores anticoagulantes	Função/Acção
Prostaciclina	Inibição da função das plaquetas
Óxido nítrico	Inibição da função das plaquetas
tPA	Importante mediador da fibrinólise endógena
TFPI	Inactiva os factores Xa, VIIa e o complexo do factor tecidual
Trombomodulina	Altera a especificidade da trombina formando o complexo trombomodulina-trombina que promove a activação da proteína C
Proteína S	Activa a proteína C que promove a inactivação dos factores Va e VIIIa
Proteoglicanos sulfato de heparina	Cofactor de antitrombina
Ecto-ADPase	Inactiva o ADP e inibe a agregação das plaquetas
Mediadores pró-coagulantes	
Factor de von Willebrand	Promove adesão das plaquetas
Factor tecidual	Cofactor para o factor VIIa
PAI-1 (inibidor do activador de plasminogénio - 1)	Inactiva o tPA

tPA, activador I do plasminogénio tecidual; TFPI, inibidor da via do factor tecidual; ADPase, difosfatase de adenosina; PAI-1, inibidor do activador de plasminogénio 1

A lesão do endotélio também é acompanhada pela expressão de várias moléculas de adesão de membrana, incluindo a P-selectina, E-selectina, ICAM-1 (do inglês, *Intercellular Adhesion Molecule 1*) e VCAM-1 (do inglês, *Vascular Cell Adhesion Molecule 1*), que são receptores e ligandos para os leucócitos. A expressão destas moléculas dá origem ao recrutamento de leucócitos, que depois se ligam ao endotélio, provocando aderência irreversível e conseqüentemente amplificam a dimensão do coágulo (Bevilacqua, 1993).

1.7 LESÃO DO ENDOTÉLIO E A TROMBOSE

A perda do equilíbrio hemostático, como consequência da lesão endotelial e da resultante disfunção endotelial, tem um papel importante em todos os tipos de distúrbios trombóticos (Cines *et al*, 1998; WU e Thiagarajan, 1996; Blann, 2003).

A trombose resulta de reacções de coagulação desproporcionadas, onde o coágulo aumenta incontrolavelmente, obstruindo o lúmen vascular (Golan *et al*, 2007). Pode ser causada devido a estimulação excessiva das CE, por uma variedade de estímulos, como por exemplo, determinadas citocinas, toxinas microbianas, mediadores lipídicos, agentes imunológicos, estase (termo associado à redução e/ou imobilização do fluxo sanguíneo), hipóxia (termo que exprime diminuição do teor de oxigénio no sangue) e “shear-stress” (Wu e Thiagarajan 1996; Malone e Agutter 2006).

1.8 ANÁLISES DE MONITORIZAÇÃO DO ENDOTÉLIO

Actualmente podem-se avaliar as funções do endotélio pela quantificação de marcadores plasmáticos solúveis como o FvW, trombomodulina solúvel, activador tecidual do plasminogénio, receptor solúvel de proteína C endotelial e a E-selectina solúvel (Blann *et al*, 2005). No entanto, estes marcadores não são suficientemente específicos e fiáveis para determinar a extensão e actividade da lesão endotelial. Por exemplo, o FvW é facilmente mensurável, mas níveis anormais deste marcador plasmático não permitem a distinção entre a activação e a lesão. Além disso, os marcadores plasmáticos são influenciados por uma variedade de factores como a insuficiência renal. Em contrapartida, a presença de células endoteliais circulantes (CEC) no sangue periférico reflectem a ocorrência de lesões no endotélio (Woywodt *et al*, 2006; Erdbrugger *et al*, 2006).

Alguns estudos apontam para uma correlação entre as CEC e os marcadores de activação plasmáticos, incluindo FvW, trombomodulina solúvel e E-selectina solúvel, o que sugere que as CEC no sangue periférico indicam a existência de lesão endotelial (Cines *et al*, 1998; Blann *et al*, 2005).

1.9 CÉLULAS ENDOTELIAIS CIRCULANTES

Apesar de há mais de 30 anos ter sido detectada a presença das CE no sangue periférico, designadas de CEC, só recentemente foi reconhecido que estas podem ser um marcador da integridade vascular (Dignat-George e Sampol, 2000).

Vários autores sugerem que as CEC são células descamadas do lúmen do endotélio vascular (Blann *et al*, 2005; Goon *et al*, 2006). Os mecanismos responsáveis pela descamação das CE ainda não são totalmente compreendidos, mas suspeita-se que a lesão mecânica, o “shear-stress”, as alterações nas moléculas de adesão tanto das CEC como do subendotélio, a apoptose, e o surgimento de uma superfície pró-inflamatória poderão desempenhar um papel importante neste processo (Dignat-George *et al*, 2000; Boss *et al*, 2006).

As CEC são raras na circulação sanguínea dos indivíduos saudáveis, têm dimensões variáveis entre 10 a 50 μm e representam entre 0,01% e 0,0001% das células mononucleares circulantes. Contudo, vários estudos indicam um aumento no número das CEC no sangue periférico de indivíduos com diferentes doenças (Dignat-George *et al*, 2003; Sabatier *et al*, 2009; Blann e Pretorius, 2006).

Para além das CEC existe um outro potencial marcador endotelial não invasivo relacionado com a lesão vascular, designado de micropartículas endoteliais (MP). Estas têm dimensões de 0,1-1 μm e são vesículas formadas a partir da membrana das CE após lesão, activação ou apoptose, que contêm proteínas da superfície das células, elementos citoplasmáticos e expressam marcadores de superfície específicos das células de onde provêm (Sabatier *et al*, 2009; Mallat *et al*, 2000).

Uma outra população de células relacionadas com as CEC são as células endoteliais progenitoras (CEP), que têm origem na medula óssea. Ao contrário das CEC, têm grande capacidade de formar colónias de células *in vitro*, havendo indícios que desempenham um papel importante tanto na angiogénese, como na manutenção dos vasos vasculares e restabelecimento do endotélio lesado (Burger *et al*, 2002). Esta

população de células também existe em pequeno número nos indivíduos saudáveis, mas tende a aumentar após lesão vascular (Gill *et al*, 2001). Alguns estudos sugerem que as CEP estão envolvidas na vasculogênese de tumores (Raffi *et al*, 2002).

1.10 QUANTIFICAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DAS CEC

Na prática um dos maiores problemas nos estudos clínicos para quantificação das CEC é a sua presença em números muito baixos no sangue periférico. Diferentes grupos de investigação usaram uma variedade de técnicas na procura do enriquecimento destas células, como a eliminação dos glóbulos vermelhos e concentração de células por centrifugação (Hladovec *et al*, 1997; Dang *et al*, 2000), preparação de suspensões de células mononucleares por densidade de centrifugação (Sbarbati *et al*, 1991; Percivalle *et al*, 1993; Solovey *et al*, 1997) e separação das CEC por esferas imunomagnéticas marcadas com determinados anticorpos, nomeadamente o anti-CD146 (Dignat-George *et al*, 1993; Mutin *et al*, 1999). No entanto, verificou-se que os procedimentos de enriquecimento celular, que implicam centrifugações e lavagens das células, conduzem inevitavelmente à perda de CE células e consequentemente a valores subestimados das CEC (Strijbos *et al*, 2008).

Relativamente à técnica de separação imunomagnética, esta pode ser realizada de forma manual ou automatizada. A separação manual tem a desvantagem de exigir uma preparação laboratorial morosa, nomeadamente em estudos que impliquem a análise de muitas amostras. O uso desta técnica requer procedimentos adicionais para confirmar a positividade das CEC, como a microscopia de fluorescência ou a citometria de fluxo (Strijbos *et al*, 2008; Khan *et al*, 2005). Uma vez que envolve várias técnicas e reagentes, aumenta o tempo de processamento da amostra e o custo das análises. No caso da separação imunomagnética automatizada, a grande desvantagem é o preço elevado do equipamento e dos reagentes que permitem a separação das CEC, e o longo tempo que demora a fazer a separação, que é de aproximadamente 4 horas (Strijbos *et al*, 2008). Além disso, a separação de CEC por esferas imunomagnéticas raramente estabelece a verdadeira pureza das células separadas, visto que, outras populações de células também expressam o CD146 (Khan *et al*, 2005).

Assim, apesar de várias metodologias terem sido aplicadas na tentativa de conseguir quantificar as CEC, a citometria de fluxo parece ser a técnica mais promissora.

Uma vantagem da citometria de fluxo, relativamente aos outros métodos, consiste na rápida análise multiparamétrica e na capacidade de detectar subpopulações. Por exemplo permite detectar subpopulações que têm elevada expressão *versus* expressão diminuída de um determinado marcador, e também permite detectar CEC activadas (por exemplo pela expressão do CD106) *versus* CEC em repouso (Clancy *et al*, 2001; Del Papa *et al*, 2004; Dome *et al*, 2009).

No entanto, a análise de eventos raros por citometria de fluxo, como a quantificação das CEC é tecnicamente exigente. São necessários muitos cuidados e uma selecção rigorosa dos anticorpos a usar.

Devido ao número reduzido de CEC no sangue periférico existe uma grande susceptibilidade à ocorrência de erros, tanto de recolha e preparação da amostra, como na análise, o que pode conduzir a valores mensuráveis não reais. Por exemplo, durante a colheita da amostra, a venipunctura pode ter um impacto negativo e contribuir para o desprendimento das CEC aumentando significativamente o número destas células (Goon *et al*, 2006; Rowand *et al*, 2007). Para minimizar o impacto da venipunctura recomenda-se a inutilização dos primeiros dois mL de sangue (Mutin *et al*, 1999).

Em citometria de fluxo, durante a análise de eventos raros, é habitual ocorrer a presença de falsos-positivos. Normalmente é devido à ligação inespecífica dos anticorpos a células não relevantes (por exemplo monócitos e linfócitos), plaquetas, micropartículas e células mortas (Goon *et al*, 2006). Este problema pode ser minimizado marcando o sangue total em vez da suspensão de células, ou através do uso de soluções bloqueadoras das ligações inespecíficas da superfície das células (como o uso de soro) (Strijbos *et al*, 2008). A realização de vários passos de limpeza do citómetro de fluxo também contribui para a diminuição da presença de falsos-positivos, impedindo que células residuais de aquisições anteriores contaminem a amostra onde se pretende quantificar as CEC. O estabelecimento de uma estratégia de “gates” e o uso de “dump channels” também é uma abordagem a ser implementada (Khan *et al*, 2005). Uma vez que o estudo de CEC implicar a aquisição de um grande número de eventos (aproximadamente 1 a 5 x 10⁶ eventos no total), a aquisição pode ser feita para que apenas a população de interesse seja observada. Assim, para além de permitir criar ficheiros de pequenas dimensões, também os torna mais facilmente analisáveis. Quanto aos “dump channels”, este termo é aplicado para definir o uso de um dos canais de fluorescência que identifica apenas as células que não são de

interesse. Estes canais permitem minimizar a presença de falsos-positivos, como por exemplo o uso do CD45 para eliminar as células hematopoiéticas ou o CD3 para excluir as células T, o CD19 para excluir as células B, ou ainda o uso de marcadores de viabilidade, como o iodeto de propídeo e a 7-aminoactinomicina D (Del Papa *et al*, 2004; Blann *et al*, 2005; Khan *et al*, 2005).

Outra causa para ocorrência de falsos-positivos é a autofluorescência, que é inerente a todas as células, embora variável. As células de maiores dimensões têm maior autofluorescência, sendo necessário controlar a voltagem e a compensação do citómetro quando se estabelece os parâmetros de aquisição (Goon *et al*, 2006).

Para detecção adequada e subsequente quantificação das CEC, é extremamente importante o uso de marcadores específicos (Stribos *et al*, 2008). Existem várias moléculas que são expressas na superfície das CE, descritas na Tabela 1.2

Tabela 1.2 – Antígenos presentes na superfície das células endoteliais (adaptado de Stribos *et al*, 2008 e Khan *et al*, 2005)

Nome do antígeno/CD	Outra designação
CD31	PECAM-1 ⁽¹⁾
CD34	Marcador de células estaminais
CD36	Receptor do colagénio 1
CD54	ICAM-1 ⁽²⁾
CD62E	E-Selectina
CD105	Endoglina
CD106	VCAM-1 ⁽³⁾
CD141	Trombomodulina
CD144	VE ⁽⁴⁾ -caderina
CD146	P1H12, S-endo-1
CD202b	Tie-2
CD309	VEGFR-2 ⁽⁵⁾ , KDR ⁽⁶⁾ , Flk-1

(1) PECAM-1, do inglês *Platelet endothelium cell adhesion molecule* ; (2) ICAM-1, do inglês *Intracellular cell adhesion molecule 1*; (3) VCAM-1, do inglês *Vascular cell adhesion molecule 1*; (4) VE, endotélio vascular; (5) VEGFR-2, do inglês *Vascular endothelial growth factor receptor 2*; (6) KDR, do inglês *Kinase insert domain receptor (VEGFR2)*

No entanto, não existe actualmente nenhum antígeno específico que se encontre unicamente nas CEC. Por exemplo, actualmente o antígeno de eleição para identificação das CEC é o CD146, que é uma molécula de adesão. Porém, este

também é expresso por subpopulações de células T activadas, células de melanomas, trofoblasto e CEP (Strijbos *et al*, 2008; Elshal *et al*, 2005; Blann *et al*, 2005;).

Como se pode analisar na figura 1.5, os antigénios que se conhece não podem ser usados isoladamente para discriminar as CEC das plaquetas, das micropartículas endoteliais, de determinadas células hematopoiéticas e das CEP (Bertolini *et al*, 2006). Toda esta informação torna difícil estabelecer qual a melhor forma para identificar as CEC. Apenas uma análise multiparamétrica, como a citometria de fluxo, e o uso de uma variedade de anticorpos em simultâneo poderá discriminar as CEC.

	Células Endoteliais Progenitoras	Células Endoteliais Circulantes	Micropartículas Endoteliais	Plaquetas	Linfócitos	Células maduras da linha mielóide	Células Progenitoras Hematopoiéticas
DNA	Expressão intensa	Expressão intensa	Negativo	Negativo	Expressão intensa	Expressão intensa	Expressão intensa
RNA	Expressão intensa	Expressão intensa	Expressão intensa	Expressão intensa	Expressão intensa	Expressão intensa	Expressão intensa
CD45	Expressão diminuída	Negativo	Negativo	Negativo	Expressão intensa	Expressão intensa	Expressão intensa
CD133	Expressão intensa	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Expressão intensa
CD34	Expressão intensa	Expressão diminuída	Expressão diminuída	Expressão diminuída	Negativo	Negativo	Expressão intensa
CD105	Subpopulações	Subpopulações	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Subpopulações
CD146	Expressão intensa	Expressão intensa	Expressão intensa	Negativo	Subpopulações	Negativo	Negativo
CD144	Expressão intensa	Expressão intensa	Expressão intensa	Negativo	Negativo	Negativo	Subpopulações
CD31	Expressão intensa	Expressão intensa	Expressão intensa	Expressão intensa	Expressão intensa	Expressão intensa	Expressão intensa
VEGFR2	Expressão intensa	Expressão intensa	Expressão intensa	Negativo	Negativo	Subpopulações	Subpopulações

Expressão intensa
 Expressão diminuída
 Negativo
 Subpopulações

Figura 1.5 - Expressão dos antigénios nas células endoteliais circulantes, micropartículas endoteliais, células endoteliais progenitoras, plaquetas e células hematopoiéticas (linfócitos, células mielóides e células progenitoras hematopoiéticas). O termo subpopulação significa que determinado antigénio é expresso apenas numa fracção de células dessa população. (Adaptado de Bertolini *et al*, 2006)

Deste modo as CEC são caracterizadas fenotipicamente pela expressão de marcadores endoteliais como o CD31 (PECAM-1), CD34, CD144 (VE-caderina), CD146 e VEGFR-2, juntamente com a ausência da expressão dos marcadores de leucócitos (CD45) e de imaturidade (CD133) (Khan *et al*, 2005; Bertolini *et al*, 2006; Blann *et al*, 2005; Goon *et al*, 2006).

Quando activadas, estas células expressam moléculas de adesão como o CD54 (ICAM-1), CD62E (E-selectina), CD106 (VCAM-1), endoglina (CD105) e marcadores de actividade pró-coagulante, como o CD142 (factor tecidual) (Goon *et al*, 2006; Blann *et al*, 2005).

O facto de as CEC serem um representante potencial do endotélio *in situ*, providencia uma oportunidade para identificar o local anatómico do vaso lesado, recorrendo a marcadores específicos. Apesar de existirem poucos anticorpos que podem ser usados para este fim, o CD36 é um marcador associado às células de origem microvascular. Esta informação serviu para determinar que as CEC nos doentes com anemia falciforme tem origem microvascular (CD36 positivas), enquanto as CEC isoladas do sangue de doentes com doença coronária aguda são predominantemente derivadas dos macrovassos (CD36 negativas) (Solovey *et al*, 1997; Mutin *et al*, 1999).

1.11 EVIDÊNCIAS DO POTENCIAL DAS CEC COMO MARCADOR DE PROGNÓSTICO E MONITORIZAÇÃO DA INTEGRIDADE VASCULAR

Uma vez que o número de CEC é muito baixo em indivíduos saudáveis, o seu aumento poderá ser um indicador da lesão estrutural da parede do vaso sanguíneo. Na realidade ainda não existem provas concretas que as CEC estejam correlacionadas com a extensão da lesão endotelial. Contudo, vários estudos indicam um aumento no número das CEC no sangue periférico de indivíduos com diferentes doenças como referido abaixo (Tabela 1.3).

Tabela 1.3 – Patologias onde foi observado um aumento no número de CEC

Grupo de doenças	Doença	Referência bibliográfica
Doenças Cardiovasculares	Enfarte Agudo do Miocárdio	Mutin <i>et al</i> , 1999
	Doença Vascular Aterosclerótica	Makin <i>et al</i> , 2004
	Síndrome Coronário Agudo	Quilici <i>et al</i> , 2004
Doenças infecciosas	Infecção por Citomegalovírus (CMV)	Percivalle <i>et al</i> , 1993; Kas-Deelen <i>et al</i> , 1998
	Choque Séptico	Mutunga <i>et al</i> , 2001
Doenças autoimunes	Púrpura Trombocitopénica Trombótica	Lefevre <i>et al</i> , 1993
	Vasculite Inflamatória	Woywodt <i>et al</i> , 2003
	Lúpus Eritematoso Sistémico	Clancy <i>et al</i> , 2001; Abdelaziz <i>et al</i> , 2008
	Doença de Kawasaki	Nakatani, <i>et al</i> , 2003
	Esclerose Sistémica	Del-Papa <i>et al</i> , 2004
Transplante	Transplante Renal	Popa <i>et al</i> , 2002

Também foi detectado um aumento do número de CEC em diferentes tipos de cancro. Esta observação foi descrita pela primeira vez quando Mancuso *et al* (2001), usando a

citometria de fluxo, verificaram que em doentes com cancro da mama ou com linfoma tinham um aumento no número de CEC. Subsequentemente vários estudos foram realizados em diferentes tipos de cancro, cujos resultados obtidos foram equivalentes. Foi encontrado um aumento das CEC no sangue periférico de indivíduos com cancro gastrointestinal (Norden-Zfoni *et al*, 2007), carcinoma metastizado (Rowand *et al*, 2007), em síndromes mielodisplásicos (Cortelezzi *et al*, 2005), na leucemia mielóide aguda (Wierzbowska *et al*, 2005) e leucemia linfocítica crónica B (Go *et al*, 2008; Gora-Tybor *et al*, 2009).

Em várias situações, a quantificação das CEC evidenciou que o número destas células é variável de acordo com a evolução clínica da doença, nomeadamente na vasculite inflamatória (Woywodt *et al*, 2003), na doença de Kawasaki (Nakatani *et al*, 2003) no lúpus eritematoso sistémico (Clancy *et al*, 2001) e na esclerose sistémica (Del Papa *et al*, 2004). O número de CEC em doentes em fase aguda é superior relativamente aos doentes em fase de remissão ou de recuperação da doença. De notar que em doentes com anemia células falciforme em fase estável da doença, o número de CEC é significativamente superior que nos indivíduos saudáveis, sugerindo uma lesão no endotélio. A monitorização das CEC nesta patologia mostrou que o seu número tende a aumentar durante os episódios de dor aguda. O controlo do número das CEC pode ter um valor preditivo das crises agudas na anemia falciforme (Solovey *et al*, 1997).

Do ponto de vista farmacológico, vários investigadores constataram que as CEC poderão ser úteis na monitorização da eficácia terapêutica. Observou-se o rápido desaparecimento das CEC da corrente sanguínea alguns dias após iniciar o tratamento com Ganciclovir em doentes infectados com CMV (Percivalle *et al*, 1993). Em indivíduos com infecção de Rickettsial, o número de CEC diminuiu após o início do tratamento, sendo concomitante com as melhoras clínicas (Dignat-George *et al*, 1993). Em doentes com Trombocitopénica Púrpura Trombótica (PTT), o plasma é modificado com Vincristina, originando uma diminuição das CEC e um aumento de plaquetas (Levefre *et al*, 1993). Woywodt *et al*, (2003) observaram uma diminuição das CEC após um tratamento bem sucedido da vasculite de pequenos vasos associada a anticorpos citoplasmáticos anti-neutrófilos.

Como as CEC são submetidas aos mesmos estímulos ambientais e aos mesmos factores de activação do endotélio das paredes dos vasos, elas poderão providenciar uma forma directa e não invasiva de analisar o fenótipo e função do endotélio. Ainda não está bem estabelecido que o endotélio vascular *in vivo* exiba as funções

patofisiológicas estabelecidas *in vitro*. Apesar de serem poucos os estudos em que analisaram número de CEC de indivíduos com enfarte agudo do miocárdio (Makin *et al*, 2004; Mutin *et al*, 1999), os resultados são consistentes, havendo aumento significativo de CEC relativamente aos indivíduos saudáveis. A quantificação das CEC em doentes com doença coronária aguda correlaciona-se com a disfunção endotelial (pela quantificação do FvW) e com o estado pró-trombótico (pela quantificação do FT) (Makin *et al*, 2004). Na anemia de células falciformes, a expressão de FT nas CEC, mesmo quando o doente se encontra clinicamente bem, sugere que estas células se encontram num estado pró-coagulante crónico. Parece que a expressão do FT pelas CEC poderá desempenhar um importante papel patológico, exagerando a activação da coagulação (Solovey *et al*, 1998). Além destas observações, verificou-se que nos doentes com anemia falciforme, a maioria das CEC expressam os receptores de adesão para os leucócitos ICAM-1, VCAM-1 e E- e P-selectina, o que sugere que o endotélio vascular adopta um fenótipo pró-inflamatório nestes doentes (Solovey *et al*, 1997). Esta activação crónica poderá ser um factor de risco para a vaso-oclusão e a activação intermitente poderá identificar uma aparente crise vaso-oclusiva imprevista (Solovey *et al*, 1998).

O endotélio está envolvido em muitas doenças, tanto como determinante primário da patofisiologia ou devido a danos colaterais causados pela evolução da doença. Quanto mais estudos forem realizados para quantificar e caracterizar as CEC em diferentes patologias, poderão surgir mais evidências quanto ao seu potencial como marcador da integridade vascular.

1.12 TROMBOEMBOLISMO VENOSO

O tromboembolismo venoso (TEV) constitui um problema grave de saúde pública, mantendo-se uma importante causa de morbilidade e mortalidade nos países desenvolvidos (López *et al*, 2004). Nos Estados Unidos, por ano, o TEV ocorre pela primeira vez em cerca de 100 pessoas em cada 100 000 pessoas (White, 2003).

O TEV resulta da formação de um coágulo oclusivo (trombo) nas veias venosas (Blann e Lip, 2006). Embora possa surgir em qualquer local do sistema venoso, os eventos clínicos predominantes ocorrem nas veias dos membros inferiores e está muitas vezes associado ao embolismo pulmonar (Blann e Lip, 2006). Cerca de um terço dos doentes com TEV manifesta embolismo pulmonar, enquanto dois terços dos doentes têm trombose das veias profundas (White, 2003).

Apesar de na última década ter havido um esclarecimento relativamente à etiopatogénese da trombose arterial, o mesmo não aconteceu com tromboembolismo venoso (Poredos e Jezovnik, 2007).

Em 1856 Virchow publicou a, agora clássica, tríade de factores que conduzem ao desenvolvimento da trombose venosa (Chung e Lip, 2003). De acordo com a tríade de Virchow, o TEV pode ocorrer quando há uma redução na velocidade ou pulsatilidade do fluxo, quando o balanço hemostático se encontra alterado e/ou quando há perda da integridade vascular (Aird, 2007b).

Entretanto, foram feitos avanços significativos para compreender os factores humorais da hipercoagulação (que está associada à redução na velocidade ou pulsatilidade do fluxo). No entanto, pouco se sabe sobre a interacção entre o endotélio e os constituintes do sangue no TEV (Poredos e Jezovnik, 2007).

O desequilíbrio entre factores anticoagulantes e pró-coagulantes podem contribuir para o desenvolvimento do trombo venoso. Isto é evidente para as associações comuns entre as deficiências de antitrombina, proteína C, proteína S, Factor V Leiden ou Protrombina 20210A e a trombose venosa (Aird 2007b). A trombofilia é assim definida como uma tendência para o desenvolvimento de tromboembolismo, devido a anomalias dos mecanismos da hemostase. O conceito de trombofilia apareceu inicialmente associado às alterações congénitas, sendo posteriormente alargado a situações adquiridas, das quais as mais comuns são a Síndrome Antifosfolípídeo, Hemoglobinúria Paroxística Nocturna e as Síndromes Mieloproliferativas (Monhanty *et al*, 2004).

O terceiro componente da tríade de Virchow é a alteração da integridade vascular. Não se trata de lesão franca do endotélio venoso, que é rara no TEV, mas sim, devido normalmente à activação endotelial devido à estase, à hipoxia e/ou a mediadores inflamatórios (Aird, 2007b).

A fisiopatologia da trombose venosa envolve tipicamente mais do que uma anomalia da tríade de Virchow, sendo que a estase não é por si só suficiente para induzir trombose, requerendo alterações simultâneas na função do endotélio e/ou activação da coagulação (Thomas, 1988). Evidências recentes sugerem que na trombose venosa a activação da coagulação mediada pelo FT (hemostase secundária) precede a activação plaquetária (hemostase primária) (López *et al*, 2004). Observações de Day

et al (2005) suportam o papel do FT da parede vascular como mediador da trombose venosa (e arterial) macrovascular induzida por estase.

No entanto a origem do factor tecidual é matéria de debate. Foi demonstrado que as CE activadas expressam FT *in vitro*, mas não existe evidência que aconteça nas CE venosas *in vivo* (Solovey *et al*, 2004). As CE quando activadas podem expressar E-selectina e P-selectina que se ligam aos leucócitos e a micropartículas. Estas ligações causam um aumento das interações leucócitos-células endoteliais e do FT e consequentemente poderão mediar a iniciação da cascata de coagulação (Aird, 2007b). Em modelos animais, foi demonstrado que o bloqueio de P-selectina e E-selectina reduzia o trombo e o conteúdo em fibrina (Sullivan *et al*, 2003). Como as CE expressam estas moléculas, é possível que contribuam para a alteração da integridade vascular e possivelmente para a formação do TEV.

1.13 Síndromes Mieloproliferativas Crónicas

As síndromes mieloproliferativas crónicas são um conjunto de doenças resultantes da expansão clonal das células hematopoiéticas multipotentes que originam a proliferação descontrolada de uma ou mais linhas celulares, nomeadamente da linha mielóide, da eritróide ou da megacariocítica (Hellmann, 2008).

De acordo com a classificação da Organização Mundial de Saúde, as síndromes mieloproliferativas crónicas incluem a leucemia mielóide crónica (LMC), a policitemia vera (PV), a trombocitemia essencial (TE), a mielofibrose idiopática crónica (MFIC), a leucemia eosinofílica crónica (LEC) e a síndrome hipereosinofílica idiopática (SIH) (Vardiman *et al*, 2002).

Das diferentes síndromes mieloproliferativas, a TE e PV são aquelas que estão associadas a um melhor prognóstico, no entanto estes doentes estão expostos a complicações causadas pela evolução da doença (Tefferi *et al*, 2000).

Na PV, cuja incidência anual estimada no Minnesota - Estados Unidos é de 2,3 *per* 100 000 pessoas (Ania *et al*, 1994), o diagnóstico é feito normalmente por volta dos 60 anos, e é ligeiramente mais comum nos homens (Gruppo Italiano Studio Policitemia 1995). Nesta patologia a proliferação clonal das células hematopoiéticas multipotentes origina um aumento em massa de eritrócitos (Landolfi *et al*, 2004). Esta expansão

pode provocar alterações na circulação sanguínea, estando muitas vezes relacionada com a hiperviscosidade (Wautier *et al*, 2007).

Quanto à trombocitose essencial (TE), esta é caracterizada por um aumento do número de plaquetas no sangue periférico (Tefferi *et al*, 2007). A estimativa da sua incidência anual no Minnesota - Estados Unidos é de 2,5 *per* 100 000 pessoas (Mesa *et al*, 1999)

O diagnóstico da TE é feito normalmente aos 60 anos e é necessário excluir tanto a trombocitose reactiva como a clonal associadas a outras patologias mielóide (Tefferi *et al*, 2000).

No decurso clínico da PV e da TE existe uma tendência para que surjam complicações vasculares, mielofibrose ou leucemia mieloblástica aguda, contudo os eventos cardiovasculares são a principal causa de morbidade e mortalidade na PV e na TE (Vannucchi, 2010). Relativamente à tendência para desenvolver trombose, sabe-se que a idade e a ocorrência prévia de episódios trombóticos são os factores de risco major para novas complicações vasculares, tanto na TE (Cortelazzo *et al*, 1990) como na PV (Marchioli *et al*, 2005).

Contudo, o mecanismo responsável pelo aumento da tendência trombótica ainda não foi elucidado (Vannucchi, 2010), e vários estudos têm sido realizados para tentar entender este mecanismo. Em 2000, Falanga *et al*, constataram *in vivo* que os doentes com TE e PV além de apresentarem activação dos leucócitos, também expressam marcadores de lesão endotelial e de activação do sistema de coagulação. Mais recentemente, Wautier *et al* (2007), realizaram um estudo onde verificaram que os eritrócitos dos doentes com PV estabeleciam ligações anormais com o endotélio, o que poderá favorecer o desenvolvimento de trombose.

Também Trappenburg *et al* (2009), encontraram um elevado nº de micropartículas com positividade para marcadores endoteliais e plaquetários em doentes com TE endoteliais.

Estas observações poderão indicar que as CE podem estar envolvidas na patogénese do TE e do PV podendo talvez contribuir para os episódios trombóticos.

1.14 Leucemia Linfocítica Crónica B

Diferentes investigadores observaram que existe um aumento de CEC em diferentes doenças hematológicas (Wierzbowska *et al*, 2005; Cortelezzi *et al*, 2005; Ronald *et al* 2008; Gora-Tybor *et al*, 2009).

Uma destas doenças, que já foi referido anteriormente para além das síndromes mieloproliferativas, é a leucemia linfocítica crónica B (LLC-B) cujos doentes apresentam um aumento das CEC (Ronald *et al*, 2008; Gora-Tybor *et al*, 2009).

A LLC-B é uma neoplasia de linfócitos B clonais (Hallek *et al*, 2008) que conduz à acumulação de pequenos linfócitos B maduros na medula óssea, no sangue periférico e nos tecidos linfóides (Goldin *et al*, 2009).

Nos países ocidentais a LLC-B é forma leucémica mais comum e afecta mais os homens do que as mulheres, normalmente por volta dos 70-79 anos de idade (Dielh *et al*, 1999).

Vários estudos demonstraram que a angiogénese está aumentada na LLC-B havendo um aumento significativo da vascularidade da medula óssea e dos nódulos linfáticos (Kini *et al*, 2000; Chen *et al*, 2000; Molica *et al*, 2002a). Além destas observações também foi descrito nos doentes com LLC-B um aumento dos diferentes factores angiogénicos como o factor de crescimento do endotélio vascular (VEGFR) (Chen *et al*, 2000; Molica *et al* 2002a; Molica *et al* 2002b) e do factor básico de crescimento dos fibroblastos (bFbF) (Kini *et al*, 2000; Molica *et al*, 2002b).

Tendo em consideração estas observações, a inclusão de um grupo de doentes com LLC-B pode constituir um grupo que garanta a detecção e estudo das CEC.

2. HIPÓTESE

As CE são um potencial marcador de prognóstico e monitorização da integridade vascular.

3. OBJETIVOS

OBJECTIVO GERAL

Estudar por citometria de fluxo as CEC de quatro grupos de doentes (tromboembolismo venoso, TEV; trombocitemia essencial, TE; policitemia vera, PV; leucemia linfocítica crónica B, LLC-B) e comparar com um grupo controlo de indivíduos saudáveis dadores benévolos de sangue.

OBJECTIVOS ESPECÍFICOS

- 1- Estabelecer valores de referência do número de CEC no sangue periférico dos controlos (indivíduos adultos saudáveis).

- 2- Determinar se os eventos patológicos no TEV, TE, PV e da LLC-B se associam a lesão endotelial e descamação das CE para a circulação, pela quantificação das CEC.

- 3- Caracterizar as CEC quanto ao estado de activação (em “repouso” ou “activadas”), e comparar se esse estadiamento é diferente entre os grupos em estudo.

- 4- Avaliar nos doentes com TEV se as CEC se correlacionam com os dados clínicos e analíticos.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 SELECÇÃO DA AMOSTRA

Os participantes foram recrutados do Serviço de Hematologia Clínica (SHC) do Centro Hospital do Porto (CHP) – Hospital de Santo António (HSA), sendo incluídos quatro grupos:

- Grupo de doentes com tromboembolismo venoso (TEV) da consulta de Trombose e Hemostase
- Grupo de doentes com Síndrome Mieloproliferativa, constituído por dois subgrupos, um de doentes com trombocitemia essencial (TE) e outro de doentes com policitemia vera (TV)
- Grupo de doentes Leucemia Linfocítica Crónica B (LLC-B)
- Grupo Controlo - Indivíduos saudáveis dadores benévolos de sangue no HGSA

O estudo foi aprovado previamente pela Comissão de Ética do CHP. Todos os participantes receberam todas as informações a esclarecer em que consistia o estudo, concordaram em participar e assinaram o termo de consentimento informado (Anexo).

4.1.1 Grupo Controlo:

Critérios de inclusão

- Ser dador de sangue no HSA
- Aceitar participar no estudo, mediante assinatura de termo de consentimento informado

Critérios de exclusão

- Ser a primeira dádiva de sangue
- Ter tido doença nos 3 meses antecedentes

4.1.2 Grupo de doentes com TEV:

Critérios de inclusão

- Ser doente das consultas de Trombose e Hemostase do HSA
- Ter história de tromboembolismo venoso com um ou mais dos seguintes critérios:
 - História familiar de trombose

- Primeiro episódio usualmente em idade jovem (< 50 anos)
- Recorrência frequente
- Eventos trombóticos sem causa aparente
- Eventos trombóticos em localização não usual
- Ter ocorrido mais de um mês depois do último episódio de TEV;
- Aceitar participar no estudo, mediante assinatura de termo de consentimento informado.

Critérios de exclusão

- Estar a efectuar tratamento anticoagulante;
- Ter processos inflamatórios ou infecciosos activos;
- Ter doença coronária aguda;
- Ter diabetes *mellitus*;
- Ter hipertensão;
- Ter doença de fígado ou rins;

4.1.3 Grupo de doentes com Síndrome Mieloproliferativa – TE e TV

Critérios de inclusão

Ter doença mieloproliferativa - policitemia vera ou trombocitemia essencial

Critérios de exclusão

- Ter processos inflamatórios agudos
- Ter doença de fígado ou rins
- Ter diabetes *mellitus*
- Estar a receber quimioterapia

4.1.4 Grupo de Doentes LLC-B

Critérios de inclusão

- Ter sido recentemente diagnosticado LLC-B pela primeira vez

Critérios de exclusão

- Estar a receber qualquer tipo de medicação

Os dados demográficos dos participantes encontram-se nas tabelas abaixo:

Tabela 4.1. Dados demográficos dos Controlos

Participante	Sexo	Idade	Nº de leucócitos (10 ³ cel/ μ L)	Nº de linfócitos (10 ³ cel/ μ L)	Nº de plaquetas (10 ³ cel/ μ L)
Controlo 1	M	58	5,6	1,5	168
Controlo 2	F	48	6,4	1,7	251
Controlo 3	M	54	7,6	2,7	203
Controlo 4	F	44	5,7	1,4	149
Controlo 5	M	38	6,6	2,0	243
Controlo 6	M	51	6,4	1,4	284
Controlo 7	M	48	6,1	2,1	187
Controlo 8	M	40	6,8	2,6	204
Controlo 9	M	34	7,9	1,2	278
Controlo 10	F	40	4,9	1,7	281
Controlo 11	F	54	5,8	1,6	199
Controlo 12	F	35	11,2	2,8	255
Controlo 13	M	52	4,9	1,6	172
Controlo 14	F	37	6,8	1,7	223
Controlo 15	F	35	5,5	1,8	176
Controlo 16	M	64	5,8	2,25	207
Controlo 17	M	60	3,9	1,2	306
Controlo 18	F	60	7,3	1,9	157
Controlo 19	F	60	7,0	2,2	256
Controlo 20	F	58	7,0	1,6	151

F = Feminino; M = Masculino

Tabela 4.2 Dados demográficos dos TEV

Participante	Sexo	Idade	Nº de leucócitos (10 ³ cel/ μ L)	Nº de linfócitos (10 ³ cel/ μ L)	Nº de plaquetas (10 ³ cel/ μ L)
TEV 1	M	38	9,3	1,9	274
TEV 2	F	60	4,8	1,8	206
TEV 3	M	25	4,2	1,3	213
TEV 4	F	30	6,8	1,6	221
TEV 5	F	22	9,5	3,2	361
TEV 6	F	32	6,7	1,6	220
TEV 7	F	37	10,1	2,9	311
TEV 8	F	51	5,8	0,8	364
TEV 9	F	65	8,9	3,2	192
TEV 10	M	56	6,3	2,4	194
TEV 11	M	23	7,5	1,5	169
TEV 12	F	38	8,5	2,5	211
TEV 13	F	41	4,8	0,8	189
TEV 14	F	30	9,8	2,5	204
TEV 15	F	44	4,9	1,5	251
TEV 16	F	56	5,1	1,9	277

F = Feminino; M = Masculino; TEV = tromboembolismo venoso

Tabela 4.3 Dados demográficos dos TE

Participante	Sexo	Idade	Nº de leucócitos (10 ³ cel/ μ L)	Nº de linfócitos (10 ³ cel/ μ L)	Nº de plaquetas (10 ³ cel/ μ L)
TE 1	M	51	7,7	2,1	1033
TE 2	F	83	11,7	1,8	633
TE 3	F	73	7,2	2,2	256
TE 4	F	45	7,3	1,8	705
TE 5	F	32	11,5	2,2	1018
TE 6	M	57	14,4	3,3	925
TE 7	F	80	11,6	2,1	635
TE 8	F	70	7,4	1,6	787

F = Feminino; M = Masculino; TE = trombocitemia essencial

Tabela 4.4 Dados demográficos dos PV

Participante	Sexo	Idade	Nº de leucócitos (10 ³ cel/ μ L)	Nº de linfócitos (10 ³ cel/ μ L)	Nº de plaquetas (10 ³ cel/ μ L)
PV 1	M	59	23,6	2,9	1026
PV 2	F	75	24,7	3,2	567
PV 3	F	57	12,6	3,3	697
PV 4	M	59	8,9	1,7	154
PV 5	M	65	8,6	2,0	250
PV 6	M	65	18,4	1,8	436
PV 7	M	82	7,1	1,7	376
PV 8	M	63	11,8	2,7	764
PV 9	M	64	16,7	2,0	473

F = Feminino; M = Masculino; PV = policitemia vera

Tabela 4.5 Dados demográficos dos LLC-B

Participante	Sexo	Idade	Nº de leucócitos (10 ³ cel/ μ L)	Nº de linfócitos (10 ³ cel/ μ L)	Nº de plaquetas (10 ³ cel/ μ L)
LLC-B1	M	78	55,5	44,6	72
LLC-B2	F	89	141,6	98,6	98
LLC-B3	M	63	157,5	149,2	71
LLC-B4	F	59	21,6	19,4	95
LLC-B5	M	71	14,6	2,8	225
LLC-B6	M	68	16,1	8,5	138
LLC-B7	M	75	13,8	4,1	237
LLC-B8	F	75	20,1	15,5	186

4.2 COLHEITA DAS AMOSTRAS DE SANGUE

As amostras de sangue foram colhidas em tubo de EDTA-K3.

As amostras de sangue do grupo controlo foram recolhida a partir dispositivo de colheita incorporado no saco de recolha da dádiva de sangue, enquanto as amostras de sangue dos doentes foram colhidas directamente por punção venosa.

4.3 CONTAGEM HEMATOLOGICA

Em todas as amostras foi realizado o hemograma no contador hematológico GEN-S (Coulter, Hialeah, Flórida). As amostras com mais de 10×10^3 leucócitos/ μL foram diluídas para que o número de células por μL fosse inferior a este valor.

4.4. CITOMETRIA DE FLUXO

Anticorpos monoclonais utilizados para identificação das CEC

As características dos anticorpos utilizados para a identificação das CEC, tanto por selecção positiva como por selecção negativa, encontram-se descritos na tabela 4.6.

Tabela 4.6 Características dos anticorpos usados para identificação das CEC

Anticorpo	Casa comercial	Especificidade	Clone	Isotipo	Fluorocromo
CD45	BD Bioscience	Leucócitos	2D1	IgG1, kappa	PerCP ⁽¹⁾
CD133	Miltenyi Biotec	Subpopulação de células estaminais progenitoras, células endoteliais progenitoras	AC133	IgG1	APC ⁽²⁾
CD146	BD Pharmigen	Células endoteliais, células de melanoma, células músculo liso, trofoblastos	P1H12	IgG1, Kappa	PE ⁽³⁾

(1) PerCP, do inglês *Peridin-chlorophyll-protein Complex*; (2) APC, do inglês *Allophycocyanin*; (3) PE, do inglês *Phycoerythrin*

Anticorpos monoclonais utilizados para caracterizar as CEC

Para além dos anticorpos anteriormente descritos, também foram usados anticorpos para verificar se as CEC são provenientes de microvasos e se estão “activadas”, analisando a expressão de moléculas de adesão e de actividade pró-coagulante.

Tabela 4.7 Anticorpos usados para caracterização das CEC

Anticorpo	Casa comercial	Especificidade	Clone	Isotipo	Fluorocromo
CD36	IOtest	Células epiteliais mamarias, monócitos, macrófagos, plaquetas, megacariócitos, reticulócitos	FA6.152	IgG1	FITC ⁽¹⁾
CD54	BD Pharmigen	Células endoteliais, linfócitos, monócitos	HA58	IgG1, Kappa	APC ⁽²⁾
CD62E	R&D systems	Células endoteliais activadas	BBIG-E5 (10C10)	IgG1	FITC ⁽¹⁾
CD106	BD Pharmigen	Células endoteliais activadas	51-10C9	IgG1, Kappa	APC ⁽²⁾
CD142	American diagnostica inc	Macrófagos, monócitos, células endoteliais	VD8	IgG1	FITC ⁽¹⁾

(1) FITC, do inglês *Fluorescein isothiocyanate* (2) APC, do inglês *Allophycocyanin*

Além destes anticorpos, no grupo de doentes com TE e PV, ainda se fez mais uma marcação adicional usando o CD61. Acrescentou-se esta marcação para determinar se as células CD146+CD45- classificadas como CEC expressavam este marcador de plaquetas, excluindo assim a presença de plaquetas contaminantes.

Tabela 4.8 Anticorpo adicional usado para melhor caracterização das CEC nos doentes TE e PV

Anticorpo	Casa comercial	Especificidade	Clone	Isotipo	Fluorocromo
CD61	BD	Plaquetas, megacariócitos	RUU-PL 7F12	IgG1	FITC ⁽¹⁾

(1) FITC, do inglês *Fluorescein isothiocyanate*

Painel de estudo

Os anticorpos anteriormente descritos foram combinados, para formar o painel que se encontra na tabela 4.9.

Tabela 4.9 Painel de anticorpos usado para estudo das CEC

Tubo	FL1 (FITC ⁽¹⁾)	FL2 (PE ⁽²⁾)	FL3 (PerCP ⁽³⁾)	FL4 (APC ⁽⁴⁾)
1	CD62E	CD146	CD45	CD133
2	CD142	CD146	CD45	CD54
3	CD36	CD146	CD45	CD106
4 (*)	CD61	CD146	CD45	...

(*) Marcação feita apenas nos doentes TE e PV; (1) FITC, do inglês *Fluorescein isothiocyanate*; (2) PE, do inglês *Phycoerythrin*; (3) PerCP, do inglês *Peridin-chlorophyll-protein Complex*; (4) APC, do inglês *Allophycocyanin*

4.5 Quantificação das CEC

O número absoluto das CEC foi determinado usando um tubo Trucount (Becton Dickinson Bioscience, San Jose, California, USA) (BDB), juntamente com a marcação CD62E/CD146/CD45/CD133. Os tubos Trucount são tubos que contêm um *pellet* liofilizado, que quando dissolvido liberta um número conhecido de esferas fluorescentes. Estas permitem determinar a concentração de CEC pela seguinte fórmula:

$$N^{\circ} \text{ absoluto de CECs} = \frac{n^{\circ} \text{ de eventos CECs}}{n^{\circ} \text{ de esferas adquiridas}} \times \frac{n^{\circ} \text{ esferas do lote}^{**}}{\text{Volume da solução no tubo}} \times \text{factor de diluição}$$

** Número fornecido na embalagem dos tubos Trucount (BD Bioscience)

Uma vez determinada a concentração de CEC em cada amostra, conseguiu-se determinar a concentração de CEC que eram positivas para o CD36, CD54, CD62E, CD106 e CD142.

4.6 Processamento das amostras

No processamento das amostras, cujo procedimento se encontra descrito abaixo, após a marcação com os diferentes anticorpos usou-se o método de lise dos eritrócitos sem lavagem, para evitar a perda de células. As amostras de sangue periférico tinham uma concentração inferior a 10×10^3 células/ μL .

O procedimento foi o seguinte:

1. Identificou-se os diferentes tubos;

- Pipetou-se para cada tubo os anticorpos de acordo com a tabela seguinte;

Tabela 4.10 Volumes usados dos diferentes anticorpos

Tipo de Tubo	Anticorpos
1 Tubo polipropileno 12 x 75 mm (Controlo Negativo)
1 Tubo Trucount	CD36 (20µL)/ CD146 (10µL)/ CD45(20µL)/ CD133 (10µL)
1 Tubo polipropileno 12 x 75 mm	CD142 (5µL)/ CD146 (10µL)/ CD45 (20µL)/ CD54 (10µL)
1 Tubo polipropileno 12 x 75 mm	CD106 (20µL)/ CD146 (10µL)/ CD45 (20µL)/ CD62E (10µL)
1 Tubo polipropileno 12 x 75 mm (*)	CD61 (20µL)/ CD146 (10µL)/ CD45 (20µL)/ ...

(*) Marcação feita apenas nas amostras de doentes com TE e PV

- Adicionou-se 200µL de sangue periférico, após ajustamento da concentração celular;
- Incubou-se no escuro durante 15 minutos, com excepção do tubo CD142/CD146/CD45/CD54 que se incubou durante 30 minutos;
- Adicionou-se 1 mL de solução de lise;
- Incubou-se durante 15 minutos;
- Adicionou-se 2 mL de PBS;
- Agitou-se a suspensão celular por vortex.

Tanto a solução de PBS como a solução de lise foram filtradas previamente, usando filtros de 0,2 µm (NALGENE®) para assegurar a não existência de impurezas que poderiam contribuir para a marcação inespecífica.

4.7 Aquisição

As amostras foram analisadas no citómetro de fluxo FACS Calibur (Becton Dickinson, San Jose, California, USA) (BD) equipado com dois lasers, um de árgon e outro de diódo vermelho, o que permite analisar 6 parâmetros em simultâneo (tamanho, granulosidade e quatro fluorescências de cores diferentes).

Foi necessário estabelecer quais as melhores condições de aquisição das amostras, tendo em consideração que as CEC se encontram na região das células mononucleares. As condições estabelecidas são as mencionadas na figura 4.1 e referem-se às voltagens dos fotodíodos e fotomultiplicadores, amplificação do sinal e modo de aquisição (linear versus logarítmico) para o forward scatter channel (FSC), side scatter channel (SSC) e fluorescências (FL1, FL2, FL3 e FL4).

Param	Detector	Voltage	Amp Gain	Mode
P1	FSC	E00	1.38	Lin
P2	SSC	400	1.00	Lin
P3	FL1	630	1.00	Log
P4	FL2	666	1.00	Log
P5	FL3	572	1.00	Log
P6	FL2-A		1.00	Lin
P7	FL2-W		1.00	Lin
P7	FL4	674		Log

Four Color DDM Param: FL1

Figura 4.1 Condições definidas para a aquisição das amostras.

O “threshold” (discriminador) para todos os parâmetros foi definido para o valor 52, excepto para a aquisição dos tubos trucount em que o “threshold” do FSC foi alterado para o valor 1, para garantir a aquisição das esferas.

Relativamente ao painel de aquisição, este foi construído usando “dot plots” e uma estratégia de “gates”. No primeiro “dot plot”, SSC/FSC, foi feito uma região (R7) de forma a excluir células mortas e detritos (figura 4.2).

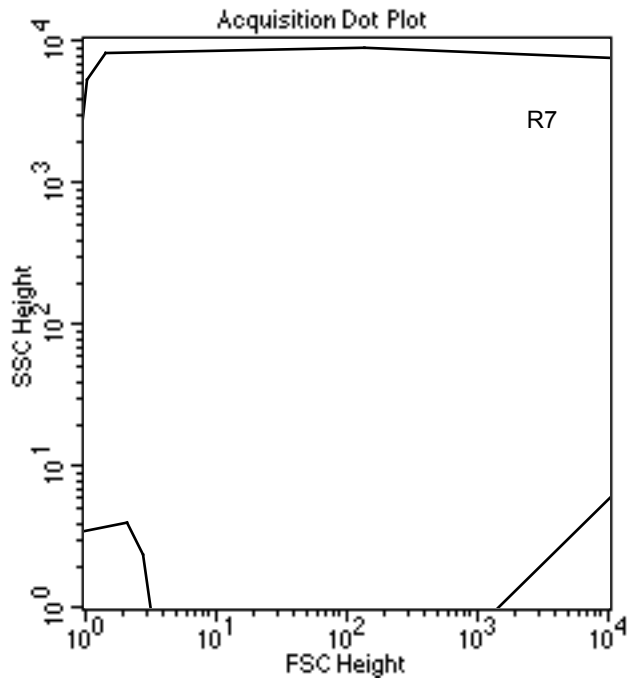


Figura 4.2 – “Dot plot” FSC/SSC com região R7 para excluir células mortas e detritos

No segundo “dot plot”, SSC/FSC, fez-se duas regiões, uma para incluir as esferas (R1), e outra (R5) para incluir as células mononucleares. Programou-se o citômetro de fluxo para que neste “dot plot” apenas houvesse aquisição dos eventos que estão no “gate” 7 (“gate” 7 = R7) do “dot plot” anterior.

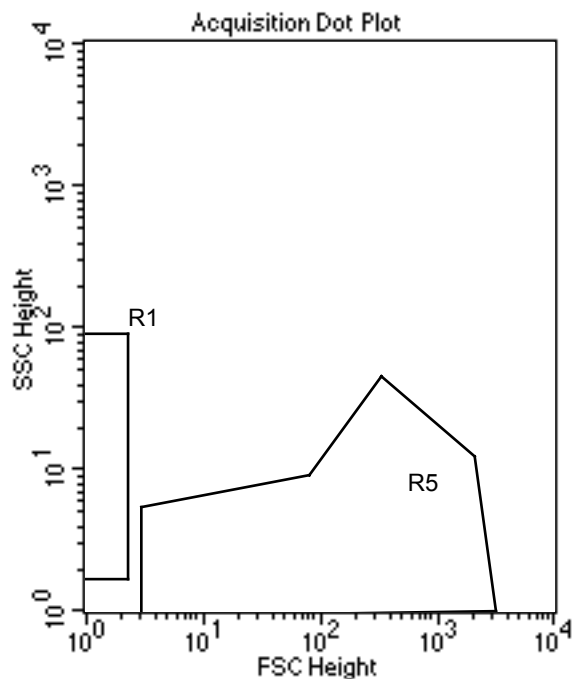


Figura 4.3 – “Dot plot” FSC/SSC com região R1, para inclui as esferas, e com região R5 na zona das células mononucleares

O terceiro “dot plot” foi construído com o objectivo de contabilizar as esferas dos tubos trucount, fazendo-se a região R6. As esferas são muito pequenas e como a região R1 adquire detritos e restos celulares, fez-se o “dot plot” (FL1/FL2), onde as esferas aparecem na diagonal no canto direito por terem fluorescência. O citómetro de fluxo foi programado para que neste “dot plot” aparecesse os eventos do “gate” 1 (“gate” 1 =R1 OR R5).

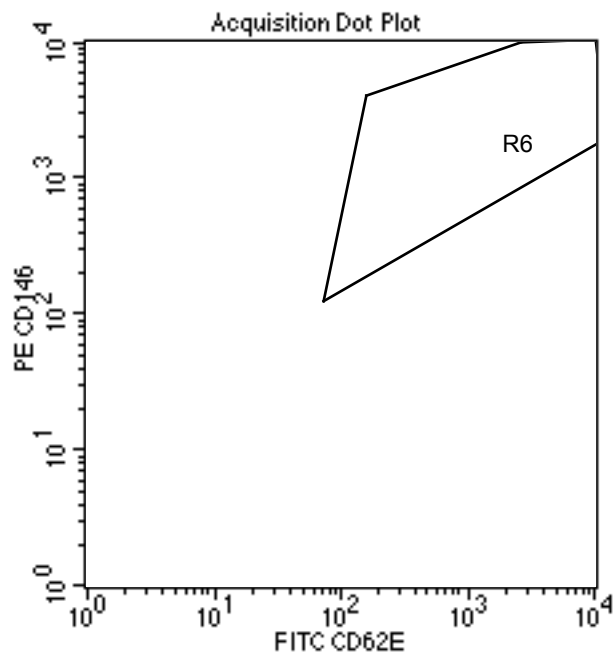


Figura 4.4 – “Dot plot” FL1/FL2 com região R6 para contabilizar as esferas adquiridas pelo citómetro de fluxo

No quarto “dot plot” (FL3/FL2) fez-se uma região (R8) de forma a assegurar a aquisição das células positivas para o CD146. O citómetro de fluxo foi programado para que neste “dot plot” apenas aparecessem os eventos da região R5

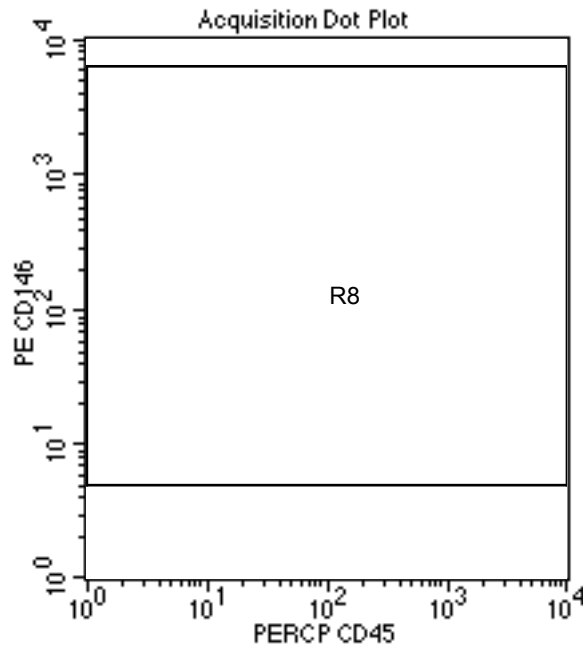


Figura 4.5 – “Dot plot” FL3/FL2 com região R8 para aquisição dos eventos CD146+

Para a aquisição de cada tubo, fez-se duas leituras. Na primeira, programou-se o citómetro de fluxo para adquirir e guardar 50.000 eventos no “gate” 7 (“gate” 7 = R7). Na segunda leitura programou-se o citómetro de fluxo para adquirir e guardar os eventos do “gate” 8 (“gate” 8 = R6 OR R8), adquirindo-se toda a suspensão celular presente no tubo.

Antes de iniciar a aquisição das amostras, procedeu-se sempre à lavagem prolongada do citómetro de fluxo, no mínimo de meia hora, para assegurar que restos celulares de aquisições anteriores não interferissem na leitura. Posteriormente, à lavagem do citómetro de fluxo e antes da leitura de cada amostra, adquiriu-se sempre um controlo negativo, para confirmar que eventos das amostras anteriores não iam interferir com os nossos resultados.

4.8 ANÁLISE

A análise dos resultados foi efectuada no software Paint-a-Gate (versão 3.0.2). As CEC (figura 4.6) foram identificadas na região das células mononucleares como sendo CD146+CD45-CD133-, enquanto as CEP foram identificadas como CD146+CD45+^{low}CD133+ (figura 4.7).

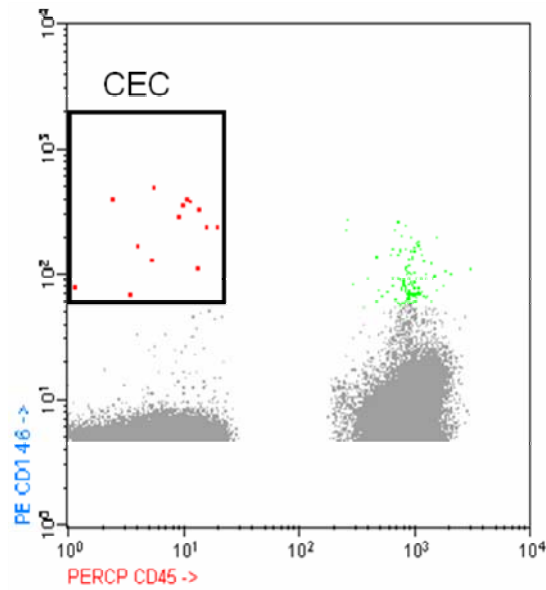


Figura 4.6. – Imagem que demonstra a selecção das CEC CD146+CD45- (eventos a vermelho). Os eventos a verde representam a subpopulação de linfócitos T CD146+CD45+.

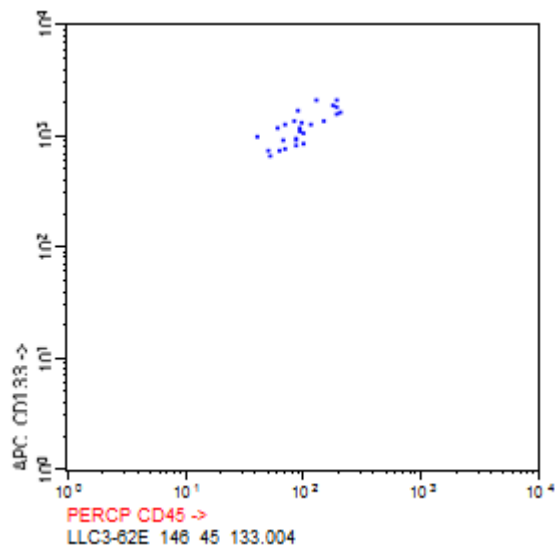


Figura 4.7. – Eventos identificados a azul representam as CEP (CD146+CD133+CD45^{low}).

4.9 ENSAIOS PRELIMINARES

No estudo de eventos muito raros, como é o caso das CEC, os passos de lavagem e centrifugações devem ser minimizados para não haver perda de células. O procedimento que conduz a menor perda de células é o método de lise de eritrócitos mas sem lavagem. No entanto, este procedimento tem a desvantagem da presença de

restos celulares provenientes dos eritrócitos lisados, aumentando o número de eventos adquiridos pelo citómetro de fluxo, nomeadamente quando diminuámos o “threshold” (discriminante) do FSC para adquirir o tubo com as esferas. Na tentativa de diminuir este número de eventos, após estabelecer o painel e as condições de aquisição para identificar as CEC, testaram-se dois procedimentos em paralelo. Para isto, usou-se quatro amostras de sangue periférico, das quais 3 pertenciam a indivíduos com LLC-B e a quarta amostra pertencia a um indivíduo com trombose arterial (TA). Dos dois procedimentos efectuados, que se descrevem de seguida, um incluía uma centrifugação após a lise dos eritrócitos, enquanto no outro este passo não foi realizado.

Procedimento 1

- Pipetou-se 100 µL sangue total + 10 µL anti-CD146 + 10 µL anti-CD45 (fez-se em duplicado)
- Incubou-se 15 minutos no escuro
- Adicionou-se 500 µL solução de lise
- Incubou-se 15 minutos
- Adicionou-se 1 mL de PBS
- Adquiriu-se no citómetro de fluxo os dois tubos efectuando apenas uma leitura.
- Após a aquisição da totalidade do conteúdo do primeiro tubo, colocou-se a aquisição em modo de pausa e trocou-se este tubo pelo segundo, adquirindo o seu conteúdo também até ao fim.

Procedimento 2

- Pipetou-se 100 µL sangue total + 10 µL anti-CD146 + 10 µL anti-CD45 (fez-se em duplicado)
- Incubou-se 15 minutos no escuro
- Adicionou-se 2 mL solução de lise
- Incubou-se 10 minutos
- Centrifugou-se a 2000 rpm, 5 minutos
- Aspirou-se o sobrenadante
- Ressuspendeu-se as células e adicionou-se 500 µL de PBS
- Adquiriu-se no citómetro de fluxo os dois tubos efectuando apenas uma leitura. Após a aquisição da totalidade do conteúdo do primeiro tubo, colocou-se a aquisição em modo de pausa e trocou-se este tubo pelo segundo, adquirindo o seu conteúdo também até ao fim.

4.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A estatística descritiva (medianas, mínimos e máximos) foi efectuada na aplicação informática Excel (Microsoft Office 2007).

A estatística inferencial foi efectuada na aplicação informática SPSS (versão 13.0). Comparou-se o nº de CEC e a expressão dos diferentes marcadores, entre os grupos de indivíduos em estudo, usando o teste de *Mann-Whitney*. As correlações foram determinadas usando o teste de Spearman. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

5.RESULTADOS

5.1 Ensaio preliminares

Conforme descrito anteriormente, na fase de otimização da técnica para análise de eventos raros, como é o caso das CEC, foram efectuados dois procedimentos em paralelo, usando três amostras de um doente com LLC-B e uma amostra de um doente com TA, cujos dados demográficos se apresentam na tabela 5.1. No primeiro procedimento, que se identificou como Procedimento 1, fez-se a lise de eritrócitos sem lavagem. No segundo, identificado como Procedimento 2, efectuou-se um passo de lavagem das células após a lise dos eritrócitos.

Tabela 5.1 - Dados demográficos das amostras usadas na primeira fase do estudo

Participante	Sexo	Idade	Número de leucócitos ($10^3\text{cel}/\mu\text{L}$)	Número de linfócitos ($10^3\text{cel}/\mu\text{L}$)	Número de plaquetas ($10^3\text{cel}/\mu\text{L}$)
LLC-B I	M	68	18,1	13,0	132
LLC-B II	M	73	34,5	27,5	173
LLC-B III	M	93	75,1	49,1	243
TA	F	54	5,0	0,8	414

Como se pode observar na figura 5.1 conseguiu-se quantificar um maior número de CEC pelo Procedimento 1 (lise de eritrócitos sem lavagem), tendo-se adoptado este procedimento.

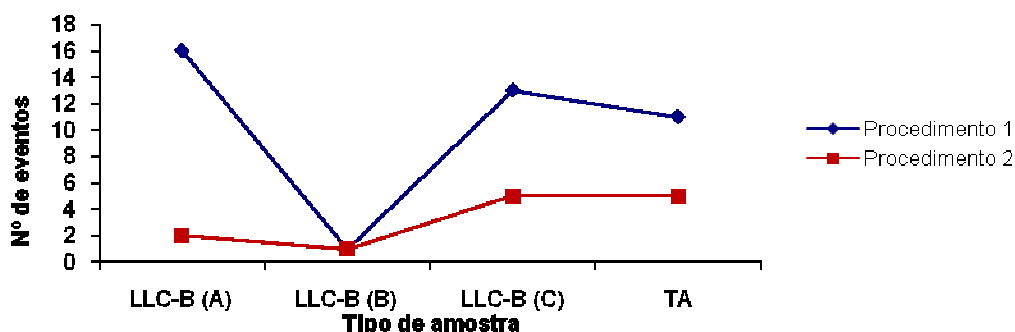


Figura 5.1 – Número de eventos de CEC obtidos pelo procedimento 1 e pelo procedimento 2.

5.2 Caracterização dos diferentes grupos em estudo

Para a execução deste trabalho foram recrutados no total 61 indivíduos, cujos dados demográficos se apresentam na tabela 5.2, expressos em mediana, mínimo e máximo.

Tabela 5.2 – Resumo dos dados demográficos dos grupos que participaram no estudo

Grupo	Número da amostra	Sexo (M/F)	Idade Mediana (min-máx) (10 ³ cel/ μ L)	Nº de leucócitos Mediana (min-máx) (10 ³ cel / μ L)	Nº de linfócitos Mediana (min-máx) (10 ³ cel/ μ L)	Nº de plaquetas Mediana (min-máx) (10 ³ cel/ μ L)
TEV	16	4/12	38,0 (22-65)	6,8 (4,2-10,1)	1,9 (0,8-3,2)	216,5 (169-364)
TE	8	2/6	63,5 (32-83)	9,6 (7,2-14,4)	2,1 (1,6-3,3)	746,0 (256-1033)
PV	9	7/2	64,0 (57-82)	12,6 (7,1-24,7)	2,0 (1,7-3,3)	473,0 (154-1026)
LLC-B	8	5/3	73,0 (59-89)	20,9 (13,8-157,5)	17,5 (2,8-149,2)	118,0 (71-237)
Controlo	20	10/10	49,5 (34-64)	6,4 (3,9-11,2)	1,7 (1,2-2,8)	205,5 (149-306)

TEV = Tromboembolismo venoso; TE = Trombocitemia essencial; PV = Policitemia vera; LLC-B = Leucemia linfocítica crónica B

No grupo de 16 doentes com TEV, 4 eram do sexo masculino e 12 eram do sexo feminino. Neste grupo, verificou-se que a mediana de idade foi de 38 anos (de 22 a 65 anos), sendo o valor mais baixo de todos os grupos em estudo. No grupo controlo, formado por 10 indivíduos do sexo masculino e 10 do sexo feminino, a mediana da idade foi de 49,5 anos (de 34 a 64 anos), enquanto nos restantes grupos a mediana de idade variou entre 63,5 anos e os 73 anos.

No grupo de doentes com LLC-B, em que 5 eram do sexo masculino e 3 eram do sexo feminino, a mediana do número de leucócitos e do número de linfócitos foi de $20,9 \times 10^3 \text{ cel}/\mu\text{L}$ e $17,5 \times 10^3 \text{ cel}/\mu\text{L}$ respectivamente. De todos os grupos, estes valores foram os mais elevados. No grupo controlo, o número de leucócitos foi de $6,4 \times 10^3 \text{ cel}/\mu\text{L}$ (de $3,9 \times 10^3 \text{ cel}/\mu\text{L}$ a $11,2 \times 10^3 \text{ cel}/\mu\text{L}$) e o número de linfócitos foi de $1,7 \times 10^3 \text{ cel}/\mu\text{L}$ ($1,2 \times 10^3 \text{ cel}/\mu\text{L}$ a $2,8 \times 10^3 \text{ cel}/\mu\text{L}$). As medianas do número de leucócitos e

do número de linfócitos nos restantes grupos de doentes foram ligeiramente superiores às do grupo controlo.

No grupo de doentes com TE, em que 2 dos doentes eram do sexo masculino e 6 eram do sexo feminino, a mediana do número de plaquetas foi a mais elevada de todos os grupos, sendo de $746 \times 10^3 \text{cel}/\mu\text{L}$ (de $256 \times 10^3 \text{cel}/\mu\text{L}$ a $1033 \times 10^3 \text{cel}/\mu\text{L}$). O segundo grupo com a mediana mais elevada foi o grupo de doentes com PV com $473,0 \times 10^3 \text{cel}/\mu\text{L}$. De todos os grupos, aquele que apresentou a mediana do número de plaquetas mais baixo foi o grupo de doentes com LLC-B, sendo de $118,0 \times 10^3 \text{cel}/\mu\text{L}$. No grupo controlo a mediana do número de plaquetas foi de $205,5 \times 10^3 \text{cel}/\mu\text{L}$ (de $149 \times 10^3 \text{cel}/\mu\text{L}$ a $306 \times 10^3 \text{cel}/\mu\text{L}$), valor muito semelhante à mediana dos doentes com TEV que foi de $216 \times 10^3 \text{cel}/\mu\text{L}$.

No grupo de doentes com TEV (n=16), além das características gerais mencionadas acima, também fez-se uma recolha dos dados clínicos e analíticos. Estes dados, que podem ser analisados na tabela 5.3, incluem o nº de trombozes, a concentração de fibrinogénio, a percentagem do factor VIIIc, a concentração da homocisteína, a concentração de d-dímeros, a percentagem de proteína S, a percentagem de proteína C e a percentagem de anti-trombina.

Tabela 5.3- Dados clínicos e analíticos dos doentes com TEV

Dados clínicos e analíticos	Mediana	Min-máx
Nº de trombozes	1	1-4
Fibrinogénio (g/L)	3,5	2,1-5,4
Factor VIIIc (%)	154,1	74,0-244,0
Homocisteína ($\mu\text{mol/L}$)	8,5	4,8-31,0
D-dímeros (ng/mL)	158,5	36,0-854,0
Proteína S (%)	86	56,5-109,0
Proteína C (%)	102,4	54,0-150,0
Anti-trombina (%)	107,5	83,0-133,0

5.3 Quantificação das CEC

O número de CEC era superior em todos os grupos de doentes relativamente ao grupo controlo (figura 5.2.).

O grupo com LLC-B foi aquele em que se detectou maior número de CEC, sendo a mediana de 4871 cel/mL, enquanto no grupo controlo foi de 504 cel/ml ($p < 0,001$).

No grupo de doentes com TEV, a mediana do número de CEC foi de 1231 cel/mL, valor muito semelhante à mediana do número de CEC do grupo com TE, 1228 cel/mL, e ligeiramente inferior à mediana do número de CEC do grupo com PV que foi de 1315 cel/mL.

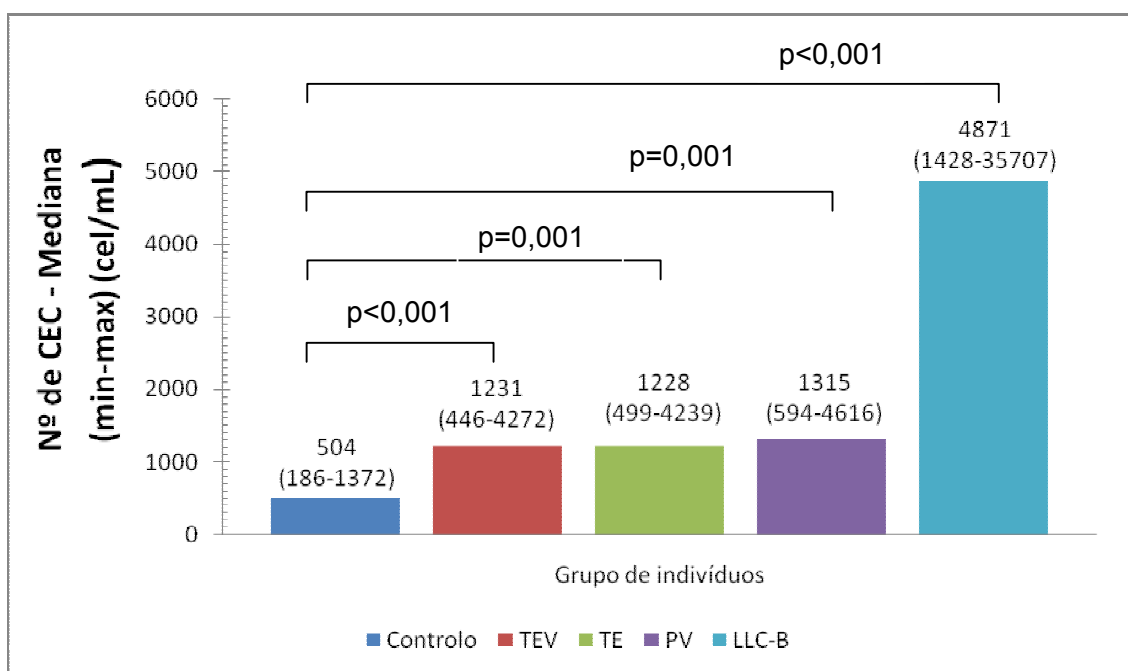


Figura 5.2 – Número de CEC nos diferentes grupos dos doentes e no grupo controlo. Os resultados estão expressos em mediana (mínimo-máximo)

5.4 Quantificação das CEP

Ao determinar o número de CEP, observou-se que nem todos os grupos de doentes apresentavam um aumento destas células relativamente ao grupo controlo (figura 5.3).

O grupo com TEV foi aquele em que se observou um menor número de CEP, sendo a mediana de 168 cel/mL, enquanto no grupo controlo a mediana foi de 295 cel/mL.

Nestes dois grupos houve diferença estatisticamente significativa quanto ao número de CEP ($p = 0,029$). No grupo com TE também a mediana do número de CEP foi inferior à do grupo controlo, 195 cel/mL, mas é de assinalar que houve doentes em que se detectou valores de CEP superiores ao grupo controlo.

Nos restantes grupos de doentes, verificou-se um ligeiro aumento do número de CEP relativamente ao grupo controlo, contudo as diferenças não eram estatisticamente significativas.

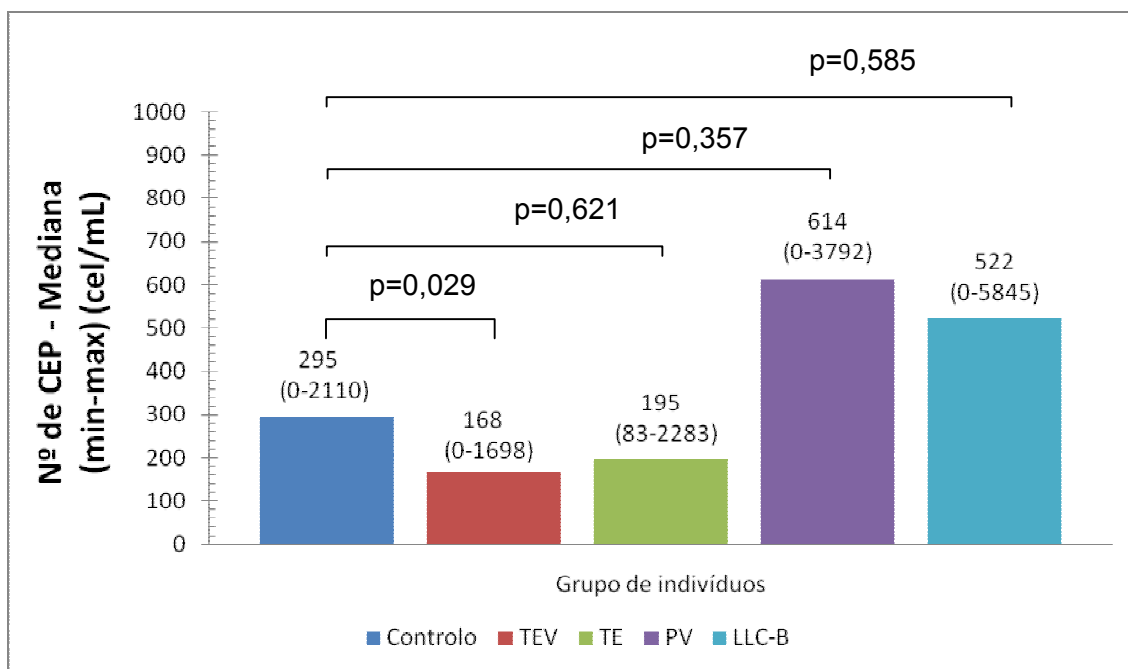


Figura 5.3 – Número de CEP nos diferentes grupos dos doentes e no grupo controlo. Os resultados estão expressos em mediana (mínimo-máximo)

5.5 Correlação entre o número de CEC e o número de leucócitos

Após determinação do nº de CEC e CEP nos diferentes grupos, estudou-se a correlação entre o nº de CEC e alguns dados demográficos dos diferentes grupos.

Começou-se por estudar a correlação entre o nº de CEC e o nº de leucócitos. Como se pode ver na tabela 5.4, encontrou-se correlação entre estes dois parâmetros em todos os grupos de doentes, havendo em simultâneo diferença estatisticamente significativa, excepto para o grupo LLC-B.

A correlação foi maior nos grupos TE ($r=0,786$) e PV ($r=0,783$). Nestes três grupos de doentes foi encontrada diferença estatisticamente significativa (TEV $p=0,041$, TE $p=0,021$, PV $p=0,013$). No grupo LLC-B observou-se a existência de uma elevada correlação, $r=0,619$, que não é estatisticamente significativa ($p=0,102$). Quanto ao

grupo controlo não foi encontrada nenhuma correlação entre o número de CEC e o número de leucócitos.

Tabela 5.4 – Correlação entre o nº de CEC e o nº de leucócitos

Grupo	Coefficiente Correlação (r) nº CEC vs nº leucócitos	p
Controlo	-0,172	0,469
TEV	0,515	0,041
TE	0,786	0,021
PV	0,783	0,013
LLC-B	0,619	0,102

5.6 Correlação entre o número de CEC e o número de linfócitos

Posteriormente analisou-se a correlação entre o nº de CEC e o nº de linfócitos. Como se pode ver, consultando a tabela 5.5, não foi encontrada correlação entre estes dois parâmetros em nenhum dos grupos em estudo. Encontrou-se uma pequena correlação no grupo TE ($r=0,412$) e PV ($r=0,437$), mas não era estatisticamente significativa.

Tabela 5.5 – Correlação entre o nº de CEC e o nº de linfócitos

Grupo	Coefficiente Correlação (r) nº CEC vs nº linfócitos	p
Controlos	-0,352	0,128
TEV	0,349	0,186
TE	0,412	0,310
PV	0,437	0,240
LLC-B	0,393	0,383

5.7 Correlação entre o número de CEC e o número de plaquetas

De seguida determinou-se a correlação entre o nº de CEC e o nº de plaquetas. Não foi encontrada qualquer correlação nos diferentes grupos, excepto para o grupo PV, $r=0,517$, não sendo estatisticamente significativa (tabela 5.6).

Tabela 5.6 – Correlação entre o nº de CEC e o nº de plaquetas

Grupo	Coefficiente Correlação (r) nº CEC vs nº plaquetas	p
Controlos	-0,277	0,238
TEV	0,25	0,350
TE	0,167	0,693
PV	0,517	0,154
LLC-B	-0,286	0,535

5.8 Quantificação de CEC CD61+ e a sua correlação com o nº de plaquetas e com o nº total de CEC nos doentes com TE e PV

Após detecção e quantificação das CEC totais, estudou-se em 7 doentes com TE e em 9 doentes com PV as CEC que eram positivas para o CD61. Verificou-se que apenas uma pequena fracção das CEC era CD61+ (figura 5.5). Dos dois grupos de doentes, o que apresentou a mediana mais alta para o número de CEC CD61+ foi o PV (mediana: PV 166 cel/mL vs TE 96 cel/mL). Não foi detectada diferença estatisticamente, apesar da variação no nº de CEC CD61+ ($p=0,536$).

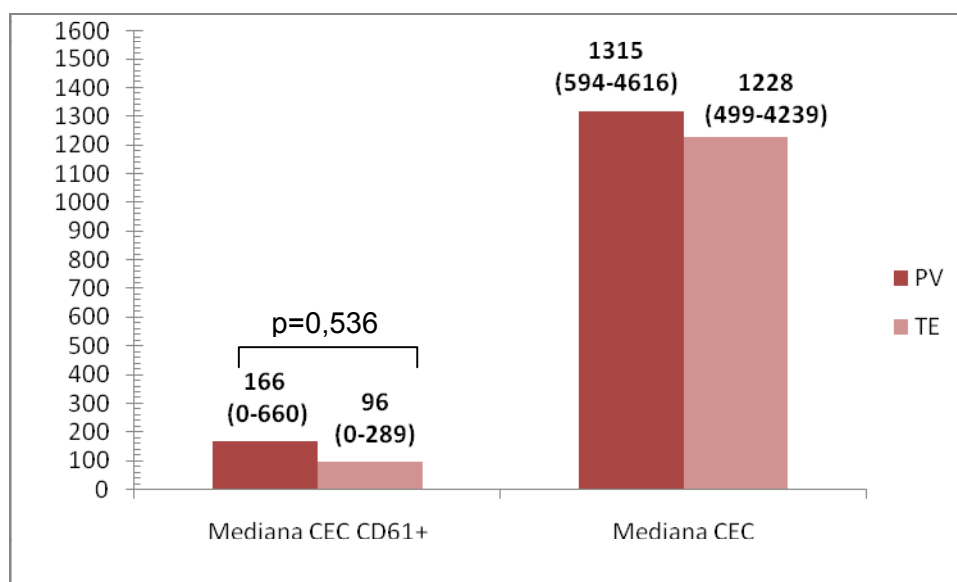


Figura 5.4- Número de CEC CD61+ e número total de CEC no grupo com TE e no grupo com PV. Resultados expressos em mediana (mínimo-máximo).

De seguida estudou-se a correlação entre as CEC CD61+ e o nº de CEC total, assim como entre as CEC CD61+ e o nº de plaquetas, tendo-se verificado que não existia correlação entre estes parâmetros (tabela 5.7).

Tabela 5.7 – Correlação entre o nº de CEC CD61+ e o nº total de CEC e entre o nº de CEC CD61+ e o nº de plaquetas no grupo com TE e no grupo com PV

Grupo	Coefficiente Correlação (r) nº CEC CD61+ vs nº CEC	p	Coefficiente Correlação (r) nº CEC CD61+ vs nº plaquetas	p
TE	0,536	0,215	0,214	0,645
PV	-0,184	0,635	-0,184	0,635

5.9 Relação do número de CEC com a idade

Também se decidiu avaliar a possibilidade da idade influenciar o número de CEC. Para isto determinou-se a correlação entre o número de CEC e a idade. Como se pode analisar na tabela 5.8, apenas foi encontrada uma ligeira correlação negativa que foi estatisticamente significativa para o grupo controlo. Isto significa que foi encontrada uma ligeira tendência para que os indivíduos saudáveis mais jovens tenham maior número de CEC. Os restantes grupos não apresentaram correlação.

Tabela 5.8 – Correlação entre o nº de CEC e a idade

Grupo	Coefficiente Correlação (r) nº CEC vs idade	p
Controlos	-0,448	0,048
TEV	-0,195	0,470
TE	0,190	0,651
PV	0,168	0,666
LLC-B	0,275	0,509

5.10 Quantificação das CEC positivas para CD54, CD62E, CD106 e CD142

A quantificação de CEC activadas, ou seja, das CEC positivas para CD54, CD62E, CD106 e a quantificação das CEC positivas para o marcador de actividade pró-coagulante (CD142) foi feita em todos os grupos em estudo (tabela 5.9).

Tabela 5.9 – Número de CEC CD54+, CEC CD62E+, CEC CD106+ e CEC CD142+ em todos os grupos que participaram no estudo.

	Controlo	TEV	p	TE	P	PV	p	LLC-B	p
CD54	72 (0-227)	238 (29-1179)	<0,001	136 (0-521)	0,500	170 (0-34)	0,062	477 (0-2744)	0,281
CD62E	145 (0-604)	683 (205-2990)	<0,001	687 (199-1398)	<0,001	526,0 (320-2390)	<0,001	2941 (928-23415)	<0,001
CD106	0 (0-12)	0 (0-506)	0,223	0,0 (0-20)	0,901	0,0 (0-0)	0,694	0,0 (0-190)	0,901
CD142	77 (0-366)	309 (93-2532)	<0,001	0,0 (0-618)	0,258	0,0 (0-1154)	0,39	89,0 (0-10978)	0,940

Constatou-se que todos os grupos de doentes tinham maior número de CEC CD54+ que o grupo controlo (tabela 5.9). Dos quatro grupos de doentes em estudo, a mediana do número de CEC CD54+ mais elevada foi para o grupo de doentes com LLC-B, 477 cel/mL, enquanto a mediana para o grupo controlo foi de 72 cel/mL. Apesar desta diferença, não se observou diferença estatisticamente significativa entre estes dois grupos. Também nos grupos TE com valor da mediana de 136 cel/mL, e no grupo PV com valor da mediana de 170 cel/mL, não houve diferença estatisticamente significativa quando comparado com o grupo controlo. Apenas no grupo de doentes com TEV, cujo o valor da mediana CEC CD54+ foi de 238 cel/mL verificou-se diferença estatisticamente significativa relativamente ao grupo controlo ($p < 0,0001$).

No que respeita à expressão de CD62E, detectou-se que todos os grupos de doentes apresentaram um nº de CEC CD62E+ superior ao grupo controlo (mediana: TEV 683 cel/mL, TE 687 cel/mL, PV 526 cel/mL, LLC-B 2941 cel/mL vs controlo 145 cel/mL), sendo estatisticamente significativa ($p < 0,001$ em todos os grupos).

Relativamente à expressão de CD106, não houve diferenças entre os grupos de doentes e o grupo controlo.

Quanto ao marcador de actividade pró-coagulante, o grupo que expressou maior nº de CEC CD142+ foi o TEV (TEV vs controlo: 309 cel/mL vs 77 cel/mL, $p < 0,001$). De notar que não houve diferenças estatisticamente significativas quanto ao nº de CEC CD142+ para os grupos com TE, PV e LLC-B comparativamente ao grupo controlo.

5.11 Quantificação de CEC CD36+

Além dos marcadores activação e pró-coagulação também se quantificou a subpopulação de CEC positivas para o marcador CD36, presumivelmente de origem microvascular. Como se pode ver na tabela 5.10, todos os grupos de doentes apresentavam um maior nº de CEC positivas para o CD36 comparativamente ao grupo controlo. O grupo de TEV foi o que teve maior número de CEC CD36+ (TEV vs controlo: 842 cel/mL vs 224 cel/mL, $p < 0,001$). Posteriormente, foi o grupo LLC-B com o valor da mediana de 657 cel/mL ($p = 0,049$). Os grupos com TE e com PV tiveram a mediana do número de CEC CD36+ muito semelhante, sendo de 523 cel/mL e 505 cel/mL respectivamente. Os valores obtidos para estes dois grupos foram estatisticamente significativos quanto ao grupo controlo (TE $p < 0,001$, PV $p = 0,004$).

Tabela 5.10 – Número de CEC CD36+ em todos os grupos que participaram no estudo.

	Controlo	TEV	p	TE	p	PV	p	LLC-B	p
CD36	224 (102-544)	842 (248-1771)	<0,001	524 (356-1377)	<0,001	505 (122-1800)	0,004	657 (0-1365)	0,049

5.12 Correlação entre o número de CEC (total e subpopulações) e os dados clínicos e analíticos dos doentes com TEV

Depois de quantificar as subpopulações de CEC positivas para os diferentes marcadores em estudo, decidiu-se estudar a correlação entre o número CEC, tanto o número total como o das suas subpopulações, e os dados clínicos e analíticos dos doentes com TEV.

Como se pode ver, consultando a tabela 5.11, encontrou-se correlação entre o número de CEC CD54+ com o fibrinogénio ($r=0,524$, $p=0,037$), e entre número de CEC CD142+ e o nº de trombozes ($r=0,568$, $p=0,022$). No caso das CEC CD106+ verificou-se que existe uma ligeira correlação com o factor VIIIc, sendo o coeficiente de correlação, r , de 0,480 no entanto não é estatisticamente significativa.

Tabela 5.11 – Correlação entre o número de CEC, tanto o número total CEC como as suas diferentes subpopulações, e os dados clínicos e analíticos dos doentes com TEV

Dados clínicos e analíticos dos doentes TEV	CEC		CEC CD36+		CEC CD54+		CEC CD62E+		CEC CD106+		CEC CD142	
	r	p	r	p	r	P	r	p	r	p	r	p
Nº de trombozes	0,201	0,456	0,312	0,240	-0,174	0,520	0,247	0,356	-0,102	0,706	0,568	0,022
Fibrinogénio	0,375	0,152	0,062	0,820	0,524	0,037	0,140	0,640	0,301	0,256	-0,266	0,320
Factor VIIIc	0,159	0,557	-0,141	0,602	0,349	0,185	0,019	0,944	0,480	0,060	-0,054	0,841
Homocisteína	-0,05	0,854	-0,185	0,492	0,010	0,970	-0,205	0,447	0,007	0,979	-0,022	0,935
D-Dímeros	0,268	0,316	0,127	0,640	0,331	0,210	-0,102	0,708	0,322	0,224	-0,134	0,621
Proteína S	0,009	0,974	-0,112	0,680	-0,100	0,713	0,024	0,931	-0,304	0,252	0,006	0,983
Proteína C	-0,247	0,356	-0,268	0,316	-0,274	0,305	-0,294	0,269	-0,268	0,315	-0,235	0,380
Anti-trombina	0,034	0,901	-0,13	0,704	0,355	0,177	0,065	0,812	-0,156	0,565	-0,327	0,216

6. DISCUSSÃO

O trabalho aqui apresentado é muito actual, pois o estudo das CEC por citometria de fluxo, como potencial marcador não invasivo de diagnóstico da lesão endotelial, só recentemente começou a ser explorado.

Além disso, de que tenhamos conhecimento, somos os primeiros a:

- a) realizar estudos de CEC por citometria de fluxo em Portugal
- b) usar em simultâneo três grupos de doentes, que têm propensão directa ou indirecta para desenvolver episódios trombóticos, para estudar o possível papel das CEC nos eventos trombóticos
- c) realizar estudos de CEC por citometria de fluxo em doentes com TEV
- d) caracterizar em simultâneo as CEC quanto à expressão de vários marcadores, como os de activação (CD54, CD62E, CD106), de actividade pró-coagulante (CD142) e de origem microvascular (CD36) em todos os grupos participantes no estudo.

Pelo que atrás foi dito, este trabalho foi desenvolvido de raiz, tendo sido necessário implementar o protocolo antes de iniciar o estudo propriamente dito. Assim, para uma melhor sistematização, optamos por discutir sequencialmente os seguintes aspectos:

1. Métodos e metodologias de quantificação de CEC e de CEP
2. CEC
3. CEP
4. CEC activadas
5. CEC de origem microvascular
6. Interação entre células endoteliais circulantes e outras células
7. CEC e risco trombótico

Métodos e metodologias de quantificação de células endoteliais circulantes

É possível estudar as CEC por diferentes técnicas e/ou conjunto de técnicas laboratoriais. Por exemplo, pode-se usar esferas magnéticas seguida de microscopia de fluorescência (Solovey *et al*, 1997; Beerepoot *et al*, 2004). Contudo a citometria de fluxo parece ser a técnica mais promissora e aquela que pode dar mais informações a cerca das CEC (Goon *et al*, 2006; Steurer *et al*, 2008) visto ter uma grande sensibilidade e permitir uma análise multiparamétrica.

Uma das grandes dificuldades do estudo das CEC deve-se ao facto de ainda não haver um consenso quanto à sua standardização por citometria de fluxo. Consultando os trabalhos publicados sobre o estudo destes eventos raros realizados apenas pela técnica de citometria de fluxo, verificamos que existem várias abordagens, tanto a nível do procedimento implementado, como na estratégia de “gates”, na escolha de anticorpos ou na forma de quantificação destas células. Por exemplo, Mancuso *et al* (2001) usaram uma estratégia de “gates” que consistiu em fazer primeiro um “gate” que excluísse as plaquetas, células mortas e detritos pelo tamanho e granulosidade e depois um “gate” que excluísse todas as células hematopoiéticas, adquirindo apenas os eventos CD45 negativos. Assim estes autores identificaram as CEC como CD45-CD146+CD31+CD34+ e quantificaram-nas pelo método de plataforma única, isto é, usando esferas para contagem absoluta de células por citometria. Contudo, Ozdogu *et al* (2007) usaram uma outra estratégia de “gates”, primeiro fizeram um “gate” para excluirmos as plaquetas e detritos através do tamanho e granulosidade e depois um “gate” para incluir apenas as células que são duplamente positivas para o CD146 e CD144, que definiram como sendo as CEC. A contagem absoluta das CEC feita por este grupo de investigadores foi calculada pelo método de plataforma dupla, isto é, multiplicando a percentagem de CEC pelo número absoluto dos glóbulos brancos obtido no contador hematológico. Estes dois exemplos demonstram a heterogeneidade da abordagem feita no estudo das CEC, mas muitos mais exemplos poderiam ser dados.

Quanto à nossa estratégia de definição das “gates”, ela consistiu em, primeiro, excluir as células mortas e detritos pelo tamanho e granulosidade, depois, em fazer um “gate” que incluísse apenas a região das células mononucleares, também pelo tamanho e granulosidade e, por último, em fazer um “gate” que incluísse todas as células CD146+, tanto as CD45- como as CD45+. Ao usar esta estratégia, a identificação das CEC só é feita no momento da análise, mas temos a vantagem de usar os linfócitos T

CD146+CD45+ como controlo positivo, o que nos permite definir correctamente as CEC que são CD146+CD45-.

Ao consultar vários trabalhos publicados, constatamos que alguns autores não revelaram as imagens dos eventos que identificaram como sendo as CEC (Shaffer *et al*, 2006; Biguzzi *et al*, 2008; Gora–Tybor *et al*, 2009), enquanto outros autores mostram imagens com pouca definição gráfica (Mancuso *et al*, 2001; Del Papa *et al*, 2004; Rajagopalan *et al* 2004; Wierzbowska *et al*, 2005; Clarke *et al*, 2008), não parecendo haver um critério rigoroso para definir os eventos positivos para o CD146. Quando comparamos as imagens apresentadas em vários trabalhos, que tinham em comum o uso do anticorpo anti-CD146 conjugado com o mesmo fluorocromo para identificar as CEC, observamos que alguns apenas consideraram os eventos com forte expressão de CD146 (Goon *et al*, 2006), enquanto outros consideravam os eventos com expressão fraca a intermédia (Rajagopalan *et al*, 2004) ou fraca a forte (Clarke *et al*, 2008) de CD146.

Relativamente ao protocolo implementado para estudo das CEC, averiguamos que também não há um consenso entre os diferentes grupos de investigadores. Há investigadores que usam o procedimento de lise de eritrócitos sem lavagem (Mancuso *et al*, 2001; Ozdogu *et al*, 2007; Mariucci *et al*, 2008), outros o procedimento de lise seguido de lavagem das células (Del Papa *et al*, 2004; Jacques *et al*, 2008; Wang *et al*, 2008).

No nosso estudo, o protocolo implementado foi o da “lise sem lavagem”, porque assegurou que minimizássemos a perda dos eventos raros. Este procedimento consistiu na marcação quádrupla com os anticorpos específicos para os antígenos que pretendíamos analisar, conjugados com diferentes fluorocromos, seguida do tratamento com a solução de lise e, finalmente, da adição 2 mL de solução de PBS. Este último passo foi feito com a intenção de diluir a solução de lise, pois é sabido que se as células estiverem muito tempo expostas a esta solução há, não só a lise dos eritrócitos, como alteração da integridade das membranas das restantes células (Tiirikainen, 1995; Vuorte *et al*, 2001). É importante notar que outros investigadores também optaram pelo procedimento de lise dos eritrócitos sem lavagem (Mancuso *et al*, 2001; Ozdogu *et al*, 2007; Mariucci *et al*, 2008). Contudo estes autores, ou não tiveram o cuidado de minimizar o efeito da solução lisante, ou não revelaram em pormenor o protocolo que usaram, descrevendo-o apenas de forma muito resumida. A grande vantagem do procedimento implementado no nosso estudo é o facto de não haver nenhuma rejeição do sobrenadante, o que minimiza a perda de células. No

entanto, esta opção tem a desvantagem de aumentar o tempo de aquisição da amostra.

Também verificamos falta de consenso no número mínimo de eventos que é necessário adquirir por tubo para poder ter uma representação da população de CEC. Quando comparamos o número mínimo de eventos adquiridos por diferentes autores, verificamos que há uma grande variabilidade. Mancuso *et al* (2001) adquiriram no mínimo 100 000 eventos. Para Ozdogu *et al* (2007) o número mínimo de 60 000 eventos foi considerado informativo, enquanto no estudo efectuado por Rigolin *et al* (2010) foram adquiridos 250 000. Pela nossa experiência, desenvolvida ao longo da realização deste estudo, verificamos que era necessário adquirir um elevado número de eventos por tubo. Por isto, optou-se por adquirir toda a suspensão celular, adquirindo no mínimo 500 000 eventos.

Células endoteliais circulantes

Quando comparamos a mediana do número de CEC do nosso grupo controlo, 504 CEC/mL (de 186 a 1372 CEC/mL), com os valores descritos na literatura, verificamos que é semelhante ao descrito por Ozdogu *et al* (2007), que detectaram uma média de CEC de 597 ± 563 CEC/mL, mas muito diferente do obtido noutros estudos. Por exemplo, para Gora-Tybor *et al* (2009) a mediana do grupo controlo foi de 3700 CEC/mL, para Go *et al* (2008) foi de 19 CEC/mL (de 4 a 66 CEC/mL) e para Trelinski *et al* (2010) foi de 5900 CEC/mL (de 3100 a 10800 CEC/mL). A heterogeneidade no número de CEC entre diferentes estudos, deve-se como já foi mencionado anteriormente, à falta de uniformidade de procedimentos entre laboratórios, o que enfatiza a necessidade de, atendendo à falta de standardização, cada laboratório determinar os seus próprios valores de referência, em função do procedimento usado.

Alguns trabalhos sugeriram que a idade influencia o nº de CEC (Shaffer *et al*, 2006). Caso isto se verifique, as CEC poderão não ser um verdadeiro indicador da lesão endotelial causado pela evolução da doença. Para elucidar esta consideração decidiu-se estudar em todos os grupos se a idade realmente interfere no nº destas células. De acordo com os nossos resultados não foi encontrada nenhuma influência da idade no número de CEC, excepto para o grupo controlo em que há uma ligeira correlação negativa que é estatisticamente significativa. Outros investigadores também estudaram a correlação entre a idade e o número de CEC (Mansuco *et al*, 2001;

Beerepoot *et al*, 2004; Shaffer *et al*, 2006; Elshal *et al*, 2008; Wierzbowska *et al*, 2008), não tendo encontrado nenhuma relação.

No nosso estudo foi observado um aumento das CEC em todos os grupos de doentes comparativamente ao grupo controlo. É importante relacionar o tipo de doença com o aumento das CEC, ou seja, para o TEV, TE e PV o aumento das CEC indica a existência de lesão endotelial, enquanto para o grupo de LLC-B poderá indicar aumento da actividade angiogénica.

De que tenhamos conhecimento, não há estudos publicados nos quais se tenham pesquisado as CEC por citometria de fluxo em doentes com TEV, mas existem estudos em doentes com LLC-B e, muito recentemente, em doentes com TE e PV.

Os estudos efectuados em doentes com LLC-B referem, de uma forma geral, um aumento destas células (Mancuso *et al*, 2001; Go *et al*, 2008; Gora-Tybor *et al*, 2009; Rigolin *et al*, 2010), embora com resultados variáveis, provavelmente em consequência dos diferentes métodos de estudo e metodologia de análise. No nosso grupo de doentes com LLC-B observamos que a mediana foi de 4871 CEC/mL (de 1428 a 35707 CEC/mL), da mesma ordem de grandeza dos encontrados por Gora-Tybor *et al* (2009), que detectaram em doentes com LLC-B valores de 13800 CEC/mL (de 4900 a 42000 CEC/mL). No entanto, Go *et al* (2008) descreveram valores de CEC de 27 CEC/mL (de 7 a 89 CEC/mL), portanto bastante inferiores.

Relativamente ao nosso grupo com TE, a mediana do número de CEC foi de 1228 células/mL (de 499 a 4239 CEC/mL), e para Trelinski *et al* (2010) foi de 20700 CEC/mL (de 10800 a 37400 CEC/mL). Quanto ao nosso grupo com PV a mediana foi de 1312 CEC/mL (de 594 a 4616 CEC/mL) e para Trelinski *et al* (2010) foi de 17600 CEC/mL (4700 a 32400 CEC/mL).

Células endoteliais circulantes precursoras

No que respeita à quantificação da CEP, verificou-se que nem todos os grupos apresentaram aumento destas células em comparação ao grupo controlo, nomeadamente o grupo com TEV e com TE. Tal observação pode ter um significado fisiológico, já que as CEP parecem estar associadas à regeneração do endotélio

lesado e à formação de novos vasos (Kalka *et al*, 2000; Vajkoczy *et al*, 2003; Delorme *et al*, 2005; Wassmann *et al*, 2006; Naik *et al*, 2008).

Assim, no nosso grupo com TEV o número de CEP foi o mais baixo de todos os grupos. Esta observação poderá indicar que a regeneração do endotélio nestes doentes está de alguma forma comprometida, contribuindo para que os doentes com TEV sejam mais susceptíveis a episódios trombóticos. Os doentes com TE também tiveram menor número de CEP que o grupo controlo, mas superior ao grupo com TEV.

Quanto aos doentes com síndrome mieloproliferativa, apenas o grupo com TE apresentou menor número de CEP que o grupo controlo, mas superiores ao grupo com TEV. Alonci *et al* (2008) que também comparam o número de CEP em doentes com TE e PV com o grupo controlo, tiveram resultados semelhantes aos nossos, pois observaram que apenas os doentes com PV tinham aumento destas células.

Células endoteliais circulantes activadas

Relativamente ao estudo das diferentes subpopulações de CEC, ou seja das CEC positivas para CD54, CD62E, CD106 e CD142, verificou-se que havia diferenças na expressão dos marcadores de activação e de actividade pró-coagulante entre os vários grupos. Todos os grupos de doentes apresentaram aumento estatisticamente significativo das CEC CD62E+ comparativamente ao grupo controlo. No entanto, apenas o grupo com TEV apresentou um aumento estatisticamente significativo para o CEC CD54+ e CEC CD142+. Nenhum dos grupos teve diferenças estatisticamente significativas de CEC CD106+ relativamente ao grupo controlo.

As CE quando activadas expressam moléculas de adesão, nomeadamente o ICAM-1 (CD54), VCAM-1 (CD106) e a E-selectina (CD62E) (Constans e Conri, 2006). Estas moléculas facilitam a adesão de leucócitos ao endotélio (Constans e Conri, 2006) podendo contribuir para a obstrução do lúmen vascular (Bevilacqua, 1993). O grupo de doentes com TEV, que é o mais susceptível à trombose, foi o que expressou maior número de moléculas de activação, além da positividade para o CD142 (factor tecidual), o que sugere que as CEC estejam envolvidas no mecanismo associado à trombose.

Células endoteliais circulantes de origem microvascular

Quanto às CEC CD36+ observou-se que todos os grupos de doentes tinham um aumento estatisticamente significativo em relação ao grupo controlo. O CD36 também é designado de glicoproteína IV (Greenwalt *et al*, 1992), e pode ser encontrado em plaquetas, monócitos e em CE de origem microvascular (Swerlick *et al*, 1992; Peltzbauer *et al*, 1993). Esta molécula facilita a ligação das plaquetas ao colagénio, monócitos, subendotélio e contribui para a activação dos monócitos e plaquetas (Greenwalt *et al*, 1992). Mancuso *et al* (2001) obtiveram resultados semelhantes ao nosso, verificando que metade das CEC do grupo de doentes com cancro e do grupo controlo tinham positividade para o CD36.

Interacção entre células endoteliais circulantes e outras células

Alguns trabalhos (Duda *et al*, 2006; Strijbos *et al*, 2007) questionam se o que se está a identificar como CEC não será antes outro tipo de células, nomeadamente plaquetas gigantes (Strijbos *et al*, 2007). Estas questões são legítimas devido à variação no número de CEC nos grupos controlos entre os diferentes trabalhos publicados, que são consequência da falta de standardização. Na tentativa de esclarecer estas dúvidas, fez-se duas avaliações. Primeiro estudou-se a correlação do número de CEC com o número de leucócitos, linfócitos e plaquetas em todos os grupos participantes no estudo, e depois avaliou-se a expressão de CEC CD61+ nos grupos com TE e PV.

No caso de as CEC serem afinal outro tipo de células esperava-se encontrar correlação entre o número de CEC e o número de leucócitos, linfócitos e plaquetas. Como foi apresentado previamente, foi encontrada uma correlação entre o número de CEC e o número de leucócitos em todos os grupos de doentes, mas só foi estatisticamente significativa para os grupos com TEV, TE e PV. Recentemente nos doentes com TE e PV foi detectado que aumento do número de leucócitos no sangue é um factor de risco preditivo de trombose (Carobbio *et al*, 2008; Landolfi *et al*, 2007). Além disso também foi demonstrado que os leucócitos polimorfonucleares nos doentes com síndrome mieloproliferativa circulam no estado activado (Falanga, *et al*, 2000; Arrelano-Rodrigo *et al*, 2006), o que pode induzir a activação e lesão do endotélio (Harlan *et al*, 1981; Westlin e Gimbrone, 1993; Falanga, *et al*, 2000). Estas observações justificam a correlação encontrada entre o número de CEC e o número de leucócitos apenas nos doentes com TE e PV, apesar de também ter sido

observada no grupo com TEV. É de notar que a correlação entre o número de CEC e o número de leucócitos só foi estatisticamente significativa para os grupos de doentes susceptíveis de trombose. Nos doentes com LLC-B, que foram o grupo que apresentou maior número de leucócitos, não houve correlação estatisticamente significativa.

Também verificámos que havia uma ligeira correlação entre o número de CEC e o número de linfócitos nos grupos com TE e PV e entre o número de CEC e o nº de plaquetas no grupo com PV, no entanto não foram estatisticamente significativas. Perante esta análise é pouco provável que o que identificamos como CEC sejam outro tipo de células.

Todavia para termos a certeza de que não estávamos a analisar plaquetas, procedeu-se à marcação de um tubo adicional usando o anticorpo anti-CD61 no estudo das CEC de 7 doentes com TE e em 9 doentes com PV. O CD61, que pode ser encontrado nas plaquetas também é conhecido como glicoproteína (gp) IIIa, que é a subunidade β da integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$ que forma o complexo gpIIb/IIIa (Calvete *et al*, 1991). O antigénio CD61 juntamente com o antigénio CD41 forma o complexo gpIIb/IIIa, que actua como receptor do fibrinogénio, do factor de von Willebrand, da fibronectina e da vitronectina desempenhando um papel na adesão e na agregação das plaquetas (Bennett e Vilaire, 1979; Ruggeri *et al*, 1982; Ginsberg *et al*, 1983; Asch e Podack, 1990; Savage, *et al* 1992, Nachman e Leung, 1998).

A marcação com o anticorpo anti-CD61 foi feita apenas nos doentes com TE e PV porque foram os dois grupos que apresentaram maior número de plaquetas. Se as células que identificamos como CEC fossem na realidade plaquetas, então todas seriam positivas para o marcador CD61, o que não foi observado no nosso trabalho. A mediana do número de CEC no grupo com TE foi 1228 CEC/mL, enquanto a mediana de CEC CD61+ foi de 96 CEC/mL, isto é, apenas cerca de 7,5% dos eventos contados como CEC expressavam CD61. Para o grupo com PV, a mediana do total de CEC foi de 1315 CEC/mL e a mediana de CEC positivas para o CD61 foi de 166 cel/mL, por outras palavras apenas 13% dos eventos contados como CEC expressavam CD61. Uma explicação possível para a presença de CEC CD61+ é a existência de agregados plaquetas-CEC em circulação. Similarmente, Trappenburg *et al* (2009) detectaram em micropartículas endoteliais de um grupo de doentes com TE positividade para um marcador característico de plaquetas. Estes autores sugeriram o estabelecimento de ligação entre as plaquetas e as células endoteliais.

Com todas estas constatações verificamos que os eventos considerados CEC não são plaquetas, ao contrário do que foi sugerido por Strijbos *et al* (2007). Perante a positividade de algumas CEC ao CD61, e para reforçar as observações anteriores, decidiu-se avaliar a presença de correlação entre o número de CEC CD61+ e o número total CEC, e entre o número de CEC CD61+ e o número de plaquetas, tendo-se verificado que não havia correlação estatisticamente significativa entre o número total de CEC e número de CEC CD61+ no grupo com TE.

Anteriormente vimos que algumas CEC eram positivas para o CD61, indicando uma possível ligação de plaquetas às CEC. Como o CD36 se expressa em plaquetas e monócitos, não podemos excluir que parte das CEC CD36+ possam corresponder a agregados CEC-monócito e/ou CEC-plaqueta.

Células endoteliais circulantes e risco trombótico

Após a análise da expressão dos diferentes marcadores, estudou-se a presença de correlação entre o nº de CEC, tanto do nº total como o das suas subpopulações, e os dados clínicos e analíticos do grupo com TEV. Nos resultados obtidos verificou-se haver correlação estatisticamente significativa entre o nº de CEC CD54+ e o fibrinogénio e entre o nº de CEC CD142+ e o nº de trombozes.

A relação encontrada entre o fibrinogénio e as CEC CD54+ é congruente com o trabalho de outros investigadores. Bombeli *et al* (1998) mostraram que a interacção do fibrinogénio com o ICAM-1 (CD54) contribui para a adesão das plaquetas às CE. Já Pluskota e D'Souza (2000) descobriram que a ligação entre o fibrinogénio e o ICAM-1 (CD54) medeia a sobrevivência das CE tendo um efeito anti-apoptótico, enquanto Tsakadze *et al* (2002) verificaram que a união destas duas moléculas nas CE conduz à ligação dos leucócitos e plaquetas o que pode originar a oclusão vascular.

Também observamos correlação entre o FT e o número de trombozes. Existem alguns trabalhos realizados em modelo animal que indicam que o FT, que é um dos principais iniciadores da cascata de coagulação, tem um papel importante no desenvolvimento de trombose, que é a consequência de reacções de coagulação desmesurada que conduz à oclusão do lúmen vascular (Golan *et al* 2007).

Pawashe *et al* (1994) mostraram em coelhos com trombozes recorrentes, que a inibição do FT usando um anticorpo monoclonal reduzia a formação do trombo.

Também Pierre *et al* (1999) fizeram esta constatação em pequenos porcos quando inibiram o FT com o inibidor da via do factor tecidual (TFPI) recombinante. Day *et al* (2005), usando pequenos ratinhos com deficiência severa de FT, observaram menos formação de trombos após lesão da artéria carótida e da veia cava inferior, do que nos ratinhos “*wild-type*”. Estes autores também demonstraram que a transplantação de medula óssea dos ratinhos “*wild-type*” para os ratinhos com deficiência de FT, não acelerava nestes a formação de trombo, sugerindo que a formação do trombo é impulsionada inicialmente pelo FT derivado das paredes vasculares.

Todos os resultados observados neste estudo contribuem para que se considere que as CEC além de revelarem a presença de lesão endotelial também estão envolvidas na patogénese da trombose.

7. CONCLUSÃO

Para a execução deste projecto foi necessária a implementação de todo o procedimento para pesquisa das CEC que são eventos muito raros no sangue periférico. Para isto foi fundamental ter em atenção uma série de pormenores, como por exemplo, o protocolo de imunofenotipagem e a estratégia de análise. De realçar que actualmente ainda não existe standardização do procedimento a aplicar para o estudo deste tipo de eventos raros, daí haver grande heterogeneidade nos valores obtidos nos diferentes estudos publicados.

A realização deste trabalho apresenta características bastante inovadoras. De que tenhamos conhecimento fomos os primeiros no País a fazer estudo de CEC e os primeiros a estudar em simultâneo três tipos de patologia com propensão para o desenvolvimento de episódios trombóticos. Algumas patologias específicas abordadas no nosso estudo, como o TEV, nunca foram alvo de estudos anteriores e outras, como é o caso da PV e da TE, só muito recentemente foram estudadas. Tanto quanto é do nosso conhecimento, o nosso estudo é também original pelo detalhe de caracterização do fenótipo das CEC, nomeadamente pelo estudo simultâneo de vários marcadores de activação, juntamente com um marcador de actividade pró-coagulante e um marcador de origem microvascular para caracterizar as CEC por citometria de fluxo.

Os resultados demonstraram um aumento estatisticamente significativo de CEC em todos os grupos de doentes em comparação com o grupo controlo. No entanto, quanto ao número de CEP, apenas o grupo com TEV teve diferença estatisticamente significativa, apresentado valores inferiores ao controlo.

Foi muito importante a inclusão dos quatro grupos de doentes, para verificarmos a existência de diferenças na expressão das moléculas de activação e actividade pró-coagulante, reforçando a ideia de que as CEC podem desempenhar uma função no mecanismo envolvido nas trombozes.

Relativamente à expressão dos marcadores de activação e de actividade pró-coagulante, apenas o grupo de doentes com TEV apresentava um maior nº de CEC positivas para o CD54 e para o CD142 comparativamente ao grupo controlo. No entanto, nos quatro grupos de doentes houve um aumento estatisticamente significativo das CEC CD62E+. Também para o marcador de origem microvascular, todos os grupos tiveram um aumento estatisticamente significativo.

Nos doentes com TEV, também verificamos que o número de CEC CD142+ se correlacionava com o nº de trombozes e que o nº de CEC CD54+ tinha correlação com os níveis de fibrinogénio.

É possível que nos doentes com TEV, não haja recuperação total do endotélio lesado devido ao baixo número de CEP, aumentando a susceptibilidade para o desenvolvimento de episódios trombóticos. Este grupo, em comparação com os restantes, foi o que apresentou CEC com maior activação e o único em que as CEC apresentam expressão de marcadores de actividade pró-coagulante. Estas observações demonstram que as CEC podem indicar o estado do endotélio e que possivelmente estão envolvidas na patogénese da trombose.

Conclui-se que as CEC, para além de revelarem a existência de lesão endotelial, podem indicar a presença de activação e de actividade pró-coagulante. Este trabalho, além de demonstrar que as CEC podem estar envolvidas no mecanismo associado ao desenvolvimento de trombozes também reforça a potencialidade de utilizar estas células como possível método de diagnóstico e/ou avaliação do estado do endotélio.

8. PERSPECTIVAS FUTURAS

Na continuação deste projecto, seria importante aumentar o número de participantes em todos os grupos para melhor evidenciar as diferentes características a nível da expressão das moléculas de activação entre as patologias. Na tentativa de contribuir para a compreensão do(s) mecanismo(s) envolvidos na trombose seria também muito importante nos grupos de doentes com TE e PV estudar a correlação entre os dados clínicos e o número e subpopulações de CEC, e comparar estes resultados com os do grupo com TEV.

Perante a dúvida de que as CEC possam ser outro tipo de células, seria muito enriquecedor para este projecto usar um conjunto de técnicas laboratoriais que nos permitisse evidenciar a sua presença de forma irrefutável. Para isso podíamos isolar as CEC por FACS *cell sorter* e posteriormente caracterizar melhor o seu fenótipo, evidenciar a presença de FvW intracelular e identificar por microscopia os corpos de Weibel-Palade, que são grânulos de armazenamento que existem apenas no interior das CEC.

Também seria importante estudar os marcadores plasmáticos de activação e de actividade pró-coagulante, para se poder determinar se o aumento da expressão à superfície das células é acompanhado pelo aumento dos marcadores na forma solúvel.

9. BIBLIOGRAFIA

ABDELAZIZ, A.; ELSHAL, M.; FATH, H.; MONGY, S.; BASYUONI, S.; AHMED, H.; ABBAS, A.; "Circulating endothelial cells in systemic lupus erythematosus: correlation with the activity of the disease"; *Journal of the Egyptian Woman's Dermatologic Society*; 5(1):31-37 (2008)

AIRD, W.; "Phenotypic Heterogeneity of the Endothelium I. Structure, Function, And Mechanisms"; *Circulation Research*; 100:158-173 (2007a)

AIRD, W. "Vascular bed-specific thrombosis"; *Journal of Thrombosis and Haemostasis*; 5 (suppl.1): 283-291(2007b)

ALONCI, A.; ALLEGRA, A.; BELLOMO, G.; PENNA, G.; D'ANGELO, A.; QUARTARONE, E.; MUSOLINO, C.;" Evaluation of circulating endothelial cells, VEGF, and VEGFR2 serum levels in patients with chronic myeloproliferative disease"; *Hematological Oncology*; 26:235-239 (2008)

ANÍA, B.; SUMAN, V.; SOBELL, J.; CODD, M.; SILVERSTEIN, M.; MELTON, J.; "Trends in the incidence of polycythemia vera among Olmsted County, Minnesota residents, 1935-1989"; *American Journal of Hematology*; 47(2): 89-93 (1994)

ARELLANO-RODRIGO, E.; ALVAREZ-LARRÁN, A.; REVERTER, J.; VILLAMOR, N.; COLOMER, D.; CERVANTES, F.; "Increased platelet and leukocyte activation as contributing mechanisms for thrombosis in essential thrombocytopenia and correlation with the JAK2 mutational status"; *Haematologica*; 91(2): 169-175 (2006)

ASCH, E.; PODACK, E.; "Vitronectin Binds to Activated Human Platelets and Play a Role in Platelet Aggregation"; *The Journal of Clinical Investigation*; 85: 1372-1378 (1990)

BAUGH, R.; BROZE, G.; KRISHNASWAMY, S.; "Regulation of extrinsic pathway factor Xa formation by tissue factor pathway inhibitor"; *Journal of Biological Chemistry*; 273(8):4378-4386 (1998)

BEEREPOOT, L.; MEHRA, J.; VERMAAT, J.; ZONNENBERG, B.; GEBBINK, M.; VOEST, E.; "Increased levels of viable circulating endothelial cells are an indicator of progressive disease in cancer patients"; *Annals of Oncology*; 15:139-145 (2004)

BENNETT, J.; VILAIRE, G.; "Exposure of platelet Fibrinogen Receptors by ADP and Epinephrine"; *The Journal of Clinical Investigation*; 64:1393-1401 (1979)

BERTOLINI, F.; SHAKED, Y.; MANCUSO, P.; KERBEL, R.; "The multifaceted circulating endothelial cell in cancer: towards marker and target identification"; *Nature Reviews Cancer*; 6(11): 835-845 (2006)

BEVILACQUA, M.; "Endothelial-leukocyte adhesion molecules"; *Annual Reviews of Immunology*; 11:767-804 (1993)

BIGUZZI, E.; MANCUSO, P.; FRANCHI, F.; CALLERI, A.; MANCUSO, M.; SANTAGOSTINO, E.; BUCCIARELLI, P.; BERTOLINI, F.; MANNUCI, P.; "Circulating endothelial cells (CECs) and progenitors (CEPs) in severe haemophiliacs with different clinical phenotype"; *British Journal of Haematology*; 144:794-805 (2008)

BLANN, A.; "Assessment of Endothelial Dysfunction: Focus on Atherothrombotic Disease"; *Pathophysiology Haemostasis and Thrombosis*; 33:256-261 (2003)

BLANN, A.; LIP, G.; "Venous thromboembolism"; British Medical Journal; 332:215-219 (2006)

BLANN, A.; PRETORIUS, A.; "Circulating endothelial cells and endothelial progenitor cells"; Atherosclerosis; 188:12-18 (2006)

BLANN, A.; WOYWODT, A.; BERTOLINI, F.; BULL, T.; BUYON, J.; CLANCY, R.; HAUBITZ, M.; HEBBEL, R.; LIP, G.; MANCUSO, P.; SAMPOL, J.; SOLOVEY, A.; DIGNAT-GEORGE, F.; "Circulating Endothelial Cells Biomarker of Vascular Disease"; Thrombosis and Haemostasis; 93: 228-235 (2005)

BOMBELI, T.; SCHWARTZ, B.; HARLAN, J.; "Adhesion of activated Platelets to Endothelial Cells: Evidence for GPIIb/IIIa-dependent Bridging Mechanism and Novel Roles for Endothelial Intercellular Adhesion Molecule 1 (ICAM-1), $\alpha_v\beta_3$ Integrin, and GPIIb"; The Journal of Experimental Medicine; 187(3):329-339 (1998)

BOSS, C.; LIP, G.; BLANN, A.; "Circulating Endothelial Cells in Cardiovascular Disease"; Journal of American College of Cardiology; 48:1538-1547 (2006)

BURGER, P.; COETZEE, S.; MCKEEHAN, W.; COOK, P.; FAN, Y.; SUDA, T.; HEBBEL, R.; NOVITSKY, N.; MULLER, W.; "Fibroblast growth factor receptor-1 is expressed by endothelial progenitor cells"; Blood; 100:3527-3535 (2002)

CALVETE, J.; HENSCHEN, A.; GONZÁLEZ-RODRIGUEZ; "Assignment of disulphide bonds in human platelet GPIIIa. A disulphide pattern for the β -subunits of the integrin family"; The Biochemical Journal; 274: 63-71 (1991)

CAROBIO, A.; ANTONIOLI, E.; GUGLIELMELLI, P.; VANNUCCHI, A.; DELAINI, F.; GUERINI, V.; FINAZZI, G.; RAMBALDI, A.; BARBUI, T.; "Leukocytosis and Risk Stratification Assessment in Essential Thrombocythemia"; Journal of Clinical Oncology; 26(16): 2732-2736 (2008)

CHEN, H.; TREWEEKW, A.; WEST, D.; TILL, K.; CAWLEY, J.; ZUZEL, M.; TOH, C.; "In vitro and in vivo production of vascular endothelial growth factor by chronic lymphocytic leukemia cells"; Blood; 96:3181-3187 (2000)

CHENG, C.; HAPEREN, R.; WAARD, M.; DAMME, L. C.; TEMPEL, D.; HANEMAAIJER, L.; CAPPELLEN, G. W.; BOS, J.; SLAGER, C. J.; DUNCKER, D. J.; STEEN, A.; CROM, R.; KRAMS, R.; "Shear-stress affects the intracellular distribution of eNOS: direct demonstration by a novel in vivo technique"; Blood; 106:3691-3698 (2005)

CHUNG, I.; LIP, G.; "Virchow's triad revisited: blood constituents"; Pathophysiology of Haemostasis and Thrombosis; 33:449-454 (2003)

CINES, D.B.; POLLAK, E. S.; BUCK, C. A.; LOSCALZO, J.; ZIMMERMAN, G. A.; MCEVER, R. P.; POBER, J. S.; WICK, T. M.; KONKLE, B. A.; SCHWARTZ, B. S.; BARNATHAN, E. S.; MCCRAE, K. R.; HUG, B. A.; SCHMIDT, A.; STERN, D. M.; "Endothelial cells in physiology and in the pathophysiology of vascular disorders"; Blood; 91:3527-3561 (1998)

CLANCY, MARDER, G.; MARTIN, V.; BELMONT, H.; ABRAMSON, S.; BUYON, J.; "Circulating activated endothelial endothelial cells in systemic lupus erythematosus: further evidence for diffuse vasculopathy"; Arthritis & Rheumatism; 67:147-153 (2001)

CLARKE, L.; SHAH, V.; ARRIGONI, F.; ELEFThERIOU, D.; HONG, Y.; KLEIN, N.; BROGAN, P.; "Quantitative detection of circulating endothelial cells in vasculitis: comparison of flow cytometry and immunomagnetic bead extraction"; *Journal of Thrombosis and Haemostasis*; 6:1025-1032 (2008)

CONSTANS, J.; CONRI, C.; "Circulating markers of endothelial function in cardiovascular disease"; *Clinica Chimica Acta*; 368:33-47 (2006)

CORTELAZZO, S.; VIERO, P.; FINAZZI, G.; D'EMILIO, A.; RODEGHIERO, F.; BARBUI, T.; "Incidence and risk factors for thrombotic complications in a historical cohort of 100 patients with essential thrombocythemia"; *Journal of Clinical Oncology*; 8(3): 556-562 (1990)

CORTELEZZI, A.; FRACCHIOLLA, N.; MAZZEO, M.; SILVESTRIS, I.; POMATI, M.; SOMALVICO, F.; BERTOLINI, F.; MANCUSO, P.; PRUNERI, G.; GIANELLI, U.; PASQUINI, M.; CORTIANA, M.; LAMBERTENGI, D.; "Endothelial precursors and mature endothelial cells are increase in the peripheral blood of myelodysplastic syndromes"; *Leukemia & Lymphoma*; 46(9):1345-1351 (2005)

DAHLBACK, B.; "Interaction between vitamin K-dependent protein S and complement protein, C4b-binding protein"; *Seminars Thrombosis and Haemostasis*; 10:139-145 (1984)

DANG, A.; WANG, B.; LI, W.; ZHENG, D.; RUAN, Y.; LIU, L.; "Plasma endothelin-1 levels and circulating endothelial cells in patients with aortoarteritis"; *Hypertension Research*; 23(5): 541-544 (2000)

DAY, S.; REEVE, J. L.; PEDERSEN, B.; FARRIS, D. M.; MYERS, D.; IM, M.; WAKEFIELD, T.; MACKMAN, N.; FAY, W.; "Macrovascular thrombosis is driven by tissue factor derived primarily from the blood vessel wall"; *Blood*; 105: 192-198 (2005)

DELORME, B.; BASIRE, A.; GENTILE, C.; SABATIER, F.; MONSONIS, F.; DESOUCHES, C.; BLOT-CHABAUD, M.; UZAN, G.; SAMPOL, J.; DIGNAT-GEORGE, F.; "Presence of endothelial progenitor cells, distinct from mature endothelial cells, within human CD146+ blood cells"; *Journal of Thrombosis and Haemostasis*; 94:1270-1279 (2005)

DEL PAPA, N., COLOMBO, G.; FRACCHIOLLA, N.; MORONETTI, L.; INGEGNOLI, F.; MAGLIONE, W.; COMINA, D.; VITALI, C.; FANTINI, F.; CORTELEZZI, A.; "Circulating Endothelial Cells as a Marker of Ongoing Vascular Disease in Systemic Sclerosis"; *Arthritis & Rheumatism*; 50(4):1296-1304 (2004)

DIEHL, L.; KARNELL, L.; MENCK, H.; "The American College of Surgeons Commission on Cancer and the American Society. The National Cancer Data Base report on age, gender, treatment, and outcomes of patients with chronic lymphocytic leukemia"; *Cancer*; 86:2684-2692 (1999)

DUDA, D.; COHEN, K.; TOMASO, E.; AU, P.; KLEIN, R.; SCADDEN, D.; WILLETT, C.; JAIN, R.; "Differential CD146 Expression on Circulating Versus Tissue Endothelial Cell in Rectal Cancer Patients: Implications for Circulating Endothelial and Progenitor Cells As Biomarkers for Antiangiogenic Therapy"; *Journal of Clinical Oncology*; 24(9): 1449-1453 (2006)

DIGNAT-GEORGE, F.; BROUQUI, P.; BOFFA, M. MUTIN, M.; DRANCOURT, M.; BRISSON, C.; RAOULT, D.; SAMPOL, J.; "Demonstration of Rickettsia conorii-induced

endothelial injury in vivo by measuring circulating endothelial cells, thrombomodulin, and von Willebrand factor in patients with Mediterranean factor in patients with Mediterranean spotted fever"; *Blood*; 82:2109-2119 (1993)

DIGNAT-GEORGE, F.; SAMPOL, J.; "Circulating endothelial cells in vascular disorders: new insights into an old concept"; *European Journal of Haematology*; 65:215-220 (2000)

DIGNAT-GEORGE, F.; SAMPOLA, J.; GREGORY, L.; BLANN, A.; "Circulating Endothelial Cells: Realities and Promises in Vascular Disorders"; *Pathophysiology of Haemostasis and Thrombosis*; 33:495-499 (2003)

DOME, B.; TIMAR, J.; LADANYI, A., PADU, S.; RENYI-VAMOS, F.; KLEPETKO, W.; LANG, P., BOGOS, K.; TOVARI, J.; "Circulating endothelial cells, bone marrow-derived endothelial progenitor cells and proangiogenic hematopoietic cells in cancer: from biology to therapy"; *Critical Reviews in Oncology/hematology*; 69:108-124 (2009)

ELSHAL, M.; KHAN, S.; TAKAHASHI, Y.; SOLOMON, M.; MCCOY, P.; "CD146 (Mel-CAM), an adhesion marker of endothelial cells, is a novel marker of lymphocyte subset activation in normal peripheral blood"; *Blood*; 106: 2923-2924 (2005)

ELSHAL, M.; ABDELAZIZ, A.; ABBAS, A.; MAHMOUD, K.; FATHY, H.; MONGY, S.; EL-BASYOUNI, S.; AHMED, H.; MCCOY, P.; "Quantification of circulating endothelial cells in peripheral blood of systemic lupus erythematosis patients: a simple and reproducible method of assessing injury and repair"; *Nephrology Dialysis Transplantation*; 1-5 (2008)

ERDBRUEGGER, U.; HAUBITZ, M.; WOYWODT, A.; "Circulating endothelial cells: A novel marker of endothelial damage"; *Clinica Chimica Acta-Elsivier*; 373: 17-26 (2006)

ESMON, C.; "The Role of Protein C and Thrombomodulin in Regulation of Blood Coagulation"; *Journal of Biological Chemistry*; 264(9):4743-4746 (1989)

FALANGA, A.; MARCHETTI, M.; EVANGELISTA, V.; VIGNOLI, A.; LICINI, M.; BALICCO, M.; MANARINI, S.; FINAZZI, G.; CERLETTI, C.; BARBUI, T.; "Polymorphonuclear leukocyte activation and hemostasis in patients with essential thrombocythemia and polycythemia vera"; *Blood*; 96:4261-4266 (2000)

FAUCI, A.; BRAUNWALD, E.; KASPER, D.; HAUSER, S.; LONGO, D.; JAMESON, J.; LOSCALZO, J.; "Harrison's Principle of Internal Medicine"; McGraw-Hill; 17th Edition; Chapter 59 (2008)

FOLKMAN, J.; SHING, Y.; "Angiogenesis"; *Journal Biological Chemistry*; 267:10931-10934 (1992)

FRANCHINI, M.; "Hemostasis and Aging"; *Critical Reviews in Oncology/Hematology*; 60:145-151 (2006)

FUKUDOME, K.; ESMON, C.; "Molecular cloning and expression of murine and bovine endothelial cell protein C/activated protein C receptor (EPCR)"; *Journal Biological Chemistry*; 270:5571-5576 (1995)

GEHLING, U. M.; ERGÜN, S.; SCHUMACHER, U.; WAGNER, C.; PANTEL, K.; OTTE, M.; SCHUCH, G.; SCHAFHAUSEN, P.; MENDE, T.; KILIC, N.; KLUGE, K.; SCHAFER,

G.; HOSSFELD; D. K.; FIEDLER, W.; "In vitro differentiation of endothelial cells from CD133-positive progenitors"; *Blood*; 95:3106-3112 (2000)

GINSBERG, M.; FORSYTH, J.; LIGHTSEY, A.; CHEDIAK, J.; PLOW, E.; "Reduced Surface Expression and Binding of Fibronectin, by Thrombin-stimulated Thrombasthenic Platelets"; *The Journal of Clinical Investigation*; 71:619-624 (1983)

GILL, M.; HATTORI, K.; RIVERA, M.; HICKLIN, D.; GIRARDI, L.; YURT, R.; HIMEL, H.; RAFFI, S.; "Vascular trauma induces rapid but transient mobilization of VEGFR-2+, AC133+ endothelial precursor cells"; *Circulation Research*; 88:167-174 (2001)

GO, R.; JOBE, B.; KRISTA, E.; CALLISTER, S.; MATHIASON, M.; MEYER, L.; BOTTER, W.; COLE, C.; FARNEN, J.; FRISBY, K.; "Circulating endothelial cells in patients with chronic lymphocytic leukemia"; *Annual Hematology*; 87:369-373 (2008)

GOLAN, D. E.; TASHJIAN, A.; ARMSTRONG, E.; ARMSTRONG, A.;" Principles of Pharmacology: the pathophysiologic basis of drug therapy"; Lippincott Williams & Wilkins; 2^a Edition; Chapter 22 (2007)

GOLDIN, L.; BJÖRKHOLM, M.; KRISTINSSON, S.; TURESSON, I.; LANDGREN, O.;"Elevated risk of chronic lymphocytic leukemia and other non-Hodgkin's lymphomas among relatives of patients with chronic leukemia"; *Haematologica*; 94(5):647-653 (2009)

GOON, P.; BOOS, C.; STONELAKE, P.; BLANN, A.; LIP, G.; "Detection and quantification of mature circulating endothelial cells using flow cytometry and immunomagnetic beads: a methodological comparison"; *Thrombosis and Haemostasis*; 96:45-52 (2006)

GORA-TYBOR, J.; JAMROZIAK, K; SIGIELSKA-KAPLON, A.; KRAWCZYNSKA, A.; LECH-MARANDA, E.; WIERZBOWSKA, A.; JESIONEK-KUPNICKA, D.; BLONSKI, J.; ROBAK, T.; "Evaluation of circulating endothelial cells as noninvasive marker of angiogenesis in patients with chronic lymphocytic"; *Leukemia & Lymphoma*; 1-6 (2009)

GREENWALT, D.; LIPSKY, R.; OCKENHOUSE, C.; IKEDA, H.; TANDON, N.; JAMIESON, G.; "Membrane glycoprotein CD36: a review of its roles in adherence, signal transduction, and transfusion medicine"; *Blood*; 80(5):1105-1115 (1992)

GRUPPO ITALIANO STUDIO POLICITÉMIA; "Polycythemia Vera: The Natural History of 1213 Patients Followed For 20 Years"; *Annals of internal Medicine*; 123:656-664 (1995)

HALLEK, M.; CHESON, B.; CATOVSKY, D.; CAPPIO-CALIGARIS, F.; DIGHIRO, G.; DÖHNER, H.; HILLMEN, P.; KEATING, M.; MONTSERRAT, E.; RAI, K.; KIPPS, T.; "Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic lymphocytic leukemia: a report from the International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia updating the National Cancer Institute – Working Group 1996 guidelines"; *Blood*; 111(12): 5446-5456 (2008)

HARLAN, J.; KILLEN, P.; HARKER, L.; STRIKER, G.;"Neutrophil-mediated Endothelial Injury In Vitro. Mechanisms of cell detachment"; *Journal of Clinical Investigation*; 68:1394-1403 (1981)

HASKEL, E.; TORR, S.; DAY, K.; MARK, P.; WUN, T.; SOBEL, B.; ABENDSCHEIN, D.; "Prevention of arterial reocclusion after thrombolysis with recombinant lipoprotein-associated coagulation inhibitor"; *Circulation*; 84:821-827 (1991)

HELLMANN, Andrzej; "Myeloproliferative syndromes: diagnosis and therapeutic options"; *Polskie Archiwum Medycyny Wewnętrznej*; 118(12):756-759 (2008)

HLADOVEC, J.; SOMMEROVA, Z.; PISARIKOVA, A.; "Homocysteinaemia and endothelial damage after methionine load"; *Thrombosis and Research*; 88:361-364 (1997)

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"; *Journal of Immunological Methods*; 337: 132-143 (2008)

KALKA, C.; MASUDA, H.; TAKAHASHI, T.; KALKA-MOL, W.; SILVER, M.; KEARNEY, M.; TI, T.; ISNER, J.; ASAHARA, T.; "Transplantation of ex vivo expanded endothelial progenitor cells for therapeutic neovascularization"; *Proceedings of the National Academy of Science of the U.S.A.*; 97(7):3422-3427 (2000)

KAS-DEELEN, A.; HARMSSEN, M.; MAAR, E.; SON, W.; THE, T.; "A sensitive method for quantifying cytomegalic endothelial cells in peripheral blood from cytomegalovirus-infected patients"; *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*; 5:622-626 (1998)

KHAN, S.; SOLOMON, M.; MCCOY, P.; "Detection of circulating endothelial cells and endothelial progenitors cells by flow cytometry"; *Cytometry Part B*; 64 (B): 1-8 (2005)

KINI, A.; KAY, N.; PETERSON, L.; "Increase bone marrow angiogenesis in B cell chronic lymphocytic leukemia"; *Leukemia*; 14:1414-1418 (2000)

LANDOLFI, R.; MARCHIOLI, R.; KUTTI, J.; GISSLINGER, H.; TOGNONI, G.; PATRONO, C.; BARBUI, T.; "Efficacy And safety of low-dose aspirin in Polycythemia Vera"; *The New England Journal of Medicine*; 350:114-124 (2004)

LANDOLFI, R.; DI GENNARO, L.; BARBIU, T.; DE STEFANO, V.; FINAZZI, G.; MARFISI, R.; TOGNONI, G.; MARCHIOLI, R.; "Leukocytosis as a major thrombotic risk factor in patients with polycythemia vera"; *Blood*; 109:2446-2452 (2007)

LEFEVRE, P.; GEORGE, F.; DURAND, J.; SAMPOL, J.; "Detection of circulating endothelial cells in thrombotic thrombocytopenia purpura"; *Thrombosis and Haemostasis*; 69:522- 527 (1993)

LIN, Y.; WEISDORF, D.; SOLOVEY, A.; HEBBEL, R. P.; "Origins of circulating endothelial cells and endothelial outgrowth from blood"; *Journal Of Clinical Investigation*; 105:71-77 (1999)

LOGES, S.; FEHSE, B.; BROCKMANN, M. A.; LAMSZUS, K; BUTZAL, M.; GUCKENBIEHL, M.; SCHUCH, G.; ERGÜN, S.; FISCHER, U.; ZANDER, A.; HOSSFELD, D.; FIEDLER, W.; GEHLING, U.; "Identification of the Adult Hemangioblast"; *Stem Cells And Development*; 13:229-242 (2004)

LÓPEZ, J.; KEARON, C.; LEE, A.; "Deep Venous Thrombosis"; *Hematology*; 439-456 (2004)

MACKMAN, N.; "Role of Tissue Factor in Hemostasis, Thrombosis, and Vascular Development"; *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*; 24:1015-1022 (2004)

MAKIN, A.; BLANN, A.; CHUNG, N.; SILVERMAN, S.; LIP, G.; "Assessment of endothelial damage in atherosclerotic vascular disease by quantification of circulating endothelial cells – Relationship with von Willebrand factor and tissue factor"; *European Heart Journal*; 25: 371-376 (2004)

MALLAT, Z.; BENAMER, H.; HUGEL, B.; BENESSIONO, J.; STEG, P.; FREYSSINET, J.; TEDGUI, A.; "Elevated levels of shed membrane microparticles with procoagulant potential in the peripheral circulating blood of patients with acute coronary syndrome"; *Circulation*; 101:841-843 (2000)

MALONE, P.; AGUTTER, P.; "The aetiology of deep venous thrombosis"; *Q J Med*; 99:581-593 (2006)

MANCUSO, P.; BURLINI, A.; PRUNERI, G.; GOLDBIRSHCH, A.; BERTOLINI, F.; "Resting and activated endothelial cells are increase in the peripheral blood of cancer patients"; *Blood*; 97:3658-3661 (2001)

MARCHIOLI, R.; FINAZZI, G.; LANDOLFI, R.; KUTTI, J.; GISSLINGER, H.; PATRONO, C.; MARILUS, R.; VILLEGAS, A.; TOGNONI, G.; BARBUI, T.; "Vascular and Neoplastic Risk in large Cohort with patients with Polycythemia Vera"; *Journal of Clinical Oncology*; 23(10):2224-2232 (2005)

MARCUS, A. J.; SAFIER, L. B.; HAJJAR, K. A.; UILMAN, H.; ISIAM, N.; BROEKMAN, J.; EIROS, A.; "Inhibition of platelets function by an aspirin-insensitive endothelial cell ADPase"; *Journal of Clinical Investigation*; 88:1690-1696 (1990)

MARIUCCI, S.; ROVATI, B.; BENCARDINO, K.; MANZONI, M.; DANOVA, M.; "Flow cytometric detection of circulating endothelial cells and endothelial progenitor cells in healthy subjects"; *International Journal of Laboratory Hematology*; 32:e40-e48 (2008)

MESA, R.; SILVERSTEIN, M.; JACOBSEN, S.; WOLLAN, P.; TEFFERI, A.; "Population-based incidence and survival figures in essential thrombocythemia and agnogenic myeloid metaplasia: an Olmsted County Study, 1976-1995"; *American Journal of Hematology*; 61 (1):10-5 (1999)

MOLICA, S.; VACCA, A.; RIBATTI, D.; CUNEO, A.; CAVAZZINI, F.; LEVATO, D.; VITELLI, G.; LUIGI, T.; ROCCARO, A.; DAMMACCO, F.; "Prognostic value of enhanced bone marrow angiogenesis in early B-cell chronic lymphocytic leukemia"; *Blood*; 100:3344-3351 (2002a)

MOLICA, S.; VITELLI, G.; LEVATO, D.; RICCIOTTI, A.; DIGIESI, G.; "Clinicoprognostic implications of increased serum levels of vascular endothelial growth factor and Basic fibroblastic growth factor in early B cell chronic lymphocytic leukemia"; *British Journal of Cancer*; 86:31-35 (2002b)

MONCADA, S.; "Nitric oxide: discovery and impact on clinical medicine"; *Journal of Royal Society of Medicine*; 92:164-169 (1999)

MONCADA, S.; "Prostacyclin and arterial wall biology"; *Arteriosclerosis*; 2:193-207 (1982)

MONHANTY, D.; GHOSH, K.; KHARE, A.; KULKARNI, B.; "Thrombophilia in coronary artery disease: A Double Jeopardy"; Indian Journal of Medicine Research; 13-23 (2004)

MONROE, D.; HOFFMANN, M.; ROBERTS, H.; "Platelets and Thrombin Generation"; Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology; 22:1381-1389 (2002)

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; 93:2951-2958 (1999)

MUTUNGA, M.; FULCON, B.; BULLOCK, R.; BATCHELOR, A.; GASCOIGNE, A.; GILLESPIE, J.; BAUDOUIN, S.; "Circulating endothelial cells in patients with septic shock"; American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine; 163: 195-200 (2001)

NACHMAN, R.; LEUNG, L.; "Complex Formation of Platelets Membrane Glycoproteins IIb and IIIa with Fibrinogen"; The Journal of Clinical Investigation; 69:263-269 (1982)

NAIK, R.; JIN, D.; CHUANG, E.; GOLD, E.; TOUSIMIS, E.; MOORE, A.; CHRISTOS, P.; DALMAS, T.; DONOVAN, D.; RAFFI, S.; VAHDAT, L.; "Circulating endothelial progenitor cells correlate to stage in patients with invasive breast cancer"; Breast Cancer Research and Treatment ; 107:133-138 (2008)

NAKATANI, K.; TAKESHITA, H.; TSUJIMOTO, H.; TOKUTOMI, T.; SEKINE, I.; "Circulating endothelial cells in Kawasaki disease"; Clinical and Experimental Immunology; 131:536-540 (2003)

NORDEN-ZFONI, A.; DESAI, J.; MANOLA, J.; ... "Blood-based biomarkers of SU11248 activity and clinical outcome in patients with metastatic imatinib-resistant gastrointestinal stromal tumor"; Clinical Cancer Research; 13:2643-2650 (2007)

OZDOGU, H.; SOZER, O.; BOGA, C.; KOZANOGLU, I.; MAYTALMAN, E.; GUZEY, M.; "Flow cytometric evaluation of circulating endothelial cells: A new protocol for identifying endothelial cells at several stages of differentiation"; American Journal of Hematology; 82:706-711 (2007)

PAWASHE, A.; GOLINO, P.; AMBROSIO, G.; MIGLIACCIO, F.; RAGNI, M.; PASCUCCI, I.; CHIARIELLO, M.; BACH, R.; GAREN, A.; KONIGSBERG, W.; "A monoclonal antibody against rabbit tissue factor inhibits thrombus formation in stenotic injured rabbit carotid arteries"; Circulation Research; 74:56-63 (1994)

PELTZBAUER, P.; BENDER, P.; WILSON, J.; POBER, J.; "Heterogeneity of dermal microvascular endothelial cell antigen expression and cytokine responsiveness in situ and cell culture"; The Journal of Immunology; 151:5062-5072 (1993)

PERCIAVALLE, E.; REVELLO, M.; VAGO, L.; MORINI, F.; GERNA, G.; "Circulating endothelial giant cells permissive for human cytomegalovirus (HCMV) are detected in disseminated HCMV infections with organ involvement"; Journal of Clinical Investigation; 92: 663-670 (1993)

PIERRE, J.; YANG, L.; TAMIRISA, K.; SCHERRER, D.; DE CIECHI, P.; EISENBERG, P.; TOLUNAY, E.; ABENDSCHEIN, D.; "Tissue Factor Pathway Inhibitor Attenuates Procoagulant Activity and Upregulation of Tissue Factor at the site of Balloon-Induced

Arterial Injury in Pigs"; *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology*; 19:2263-2268 (1999)

PLUSKOTA, E.; D'SOUZA, S.; "Fibrinogen interactions with ICAM-1 (CD54) regulate endothelial cell survival"; *European Journal of Biochemistry*; 267:4693-4704 (2000)

POPA, E.; KAS-DEELEN, A.; HEPKEMA, B.; ... "Donor-derived circulating endothelial cells after kidney transplantation"; *Transplantation*; 74:1320-1327 (2002)

POREDOS, P.; JEZOVIK, M.; "The role of inflammation in venous thromboembolism and the link between arterial and venous thrombosis"; *International Angiology*; 26:306-311 (2007)

QUILICI, J.; BANZET, N.; PAULE, P.; MEYNARD, J.; MUTIN, M.; BONNET, J.; AMBROSI, P.; SAMPOL, J.; DIGNAT-GEORGE, F.; "Circulating Endothelial Cell Count as a Diagnostic Marker for Non-ST-Elevation Acute Coronary Syndrome"; *Circulation*; 110: 1586-1591 (2004)

RADOMSKI, M. W.; PALMER, P.; MONCADA, S.; "The anti-aggregating properties of vascular endothelium interactions between prostacyclin and nitric oxide"; *British Journal of Pharmacology*; 92:639-646 (1987)

RAFFI, S.; LYDEN, D.; BENEZRA, R; HATTORI, K; HEISSIG, B.; "Vascular and haematopoietic stem cells: novel targets for anti-angiogenesis therapy?"; *Nature Review Cancer*; 2: 826-835 (2002)

RAJAGOPALAN, S.; SOMERS, E.; BROOK, R.; KEHRER, C.; PFENNINGER, D.; LEWIS, E.; CHAKRABARTI, A.; RICHARDSON, B.; SHELDEN, E.; McCUNE, J.; KAPLAN, M.; "Endothelial cell apoptosis in systemic lupus erythematosus: a common pathway for abnormal vascular function and thrombosis propensity"; *Blood*; 103:3677-3683 (2004)

RIGOLIN, G.; MAFFEI, R.; RIZZOTTO, L.; CICCONE, M.; SOFRITTI, O.; DAGHIA, G.; CIBIEN, F.; CAVAZZINI, F.; MARASCA, R.; CUNEO, A.; "Circulating Endothelial Cells in Patients With Chronic Lymphocytic Leukemia: Clinical-Prognostic and Biologic Significance"; *Cancer*; 116(8): 1926-1937 (2010)

RISAU, W., SARIOLA, H.; ZERWES, H. G.; SASSE, J.; EKLBLUM, P.; KEMLER, R.; DOETSCHMANN, T.; "Vasculogenesis and angiogenesis in embryonic stem cell-derived embryoid bodies"; *Development*; 102:471-478 (1988)

ROGERS, G.; "Hemostatic properties of normal and perturbed vascular cells"; *FASEB Journal*; 2: 116-123 (1988)

RONALD, G.; JOBE, D.; ASP, K.; CALLISTER, S.; MATHIASON, M.; MEYER, L.; BOTTNER, W.; COLE, C.; FARNEN, J.; FRISBY, K.; "Circulating endothelial cells in patients with chronic lymphocytic leukemia"; *Annals of Hematology*; 87:369-373 (2008)

ROWAND, J.; MARTIN, G., DOYLE, G.; MILLER, C.; PIERCE, M.; CONNELLY, M.; RAO, C.; TERSTAPPEN, W.; "Endothelial Cells in Peripheral Blood of Healthy Subjects and Patients with Metastatic Carcinomas"; *Cytometry Part A*; 71 (A): 105-113 (2007)

RUGGERI, Z.; BADER, R.; DE MARCO, L.; "Glanzmann thrombasthenia: Deficient binding of von Willebrand factor to thrombin-stimulated platelets"; Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.;79:6038-6041 (1982)

SABATIER, F.; CAMOIN-JAU, L.; ANFOSSO, F.; DIGNAT-GEORGE, F.; "Circulating endothelial cells, microparticles and progenitors: key players towards the definition of vascular competence"; Journal of Cellular and Molecular Medicine; 13(3): 454-471 (2009)

SAVAGE, B.; SHATTIL, S.; RUGGERI, M.; "Modulation of Platelet Function through Adhesion Receptors. A Dual Role For Glycoprotein IIb-IIIa (Integrin $\alpha_{IIb}\beta_{IIIa}$) Mediated By Fibrinogen And Glycoprotein Ib – Von Willebrand Factor"; The Journal of Biological Chemistry; 267(16):11300-11306 (1992)

SBARBATI, R.; BOER, M.; MARZILLI, M.; SCARLATTINI, M.; ROSSI, G.; MOURIK, J.; "Immunologic detection of endothelial cells in human whole blood"; Blood; 77 (4):764-769 (1991)

SHAFFER, R.; GREENE, S.; ARSHI, A.; SUPPLE, G.; BANTLY, A.; MOORE, J.; MOHLER, E.; "Flow Cytometric Measurement of Circulating Endothelial Cells: The Effect of Age and Peripheral Arterial Disease on Baseline Levels of Mature and Progenitor Populations"; Cytometry Part B (Clinical Cytometry); 70B:56-62 (2006)

SHI, Q.; RAFI, S.; WU, M. H.; WIJELATH, E. S.; YU, C.; ISHIDA, A.; FUJITA, Y.; KOTHARIN, S.; MOHLE, R.; SAUVAGE, L. R.; MOORE, M. A.; STORB, R. F.; HAMMOND, W. P.; "Evidence for circulating bone marrow-derived endothelial cells"; Blood; 92:362-367 (1998)

SOLOVEY, A.; GUI, K.; HEBBEL, R.; "Tissue factor expression by endothelial cells in sickle cell anemia" Journal of Clinical investigation; 9:1899-1904 (1998)

SOLOVEY, A.; KOLLANDER, R.; SHET, A.; MILBAUER, L.; CHOONG, S.; PANOSKALTSIS-MORTARI, A.; BLAZAR, B.; KELM, R.; HEBBEL, R.; "Endothelial cell expression of tissue factor in sickle mice is augmented by hypoxia/reoxygenation and inhibited by lovastatin"; Blood; 104:3190-7 (2004)

SOLOVEY, A.; LIN, Y.; BROWNE, P.; CHOONG, S.; WAYNER, E.; HEBBEL, R.; "Circulating activated endothelial cells in sickle cell anemia"; New England Journal of Medicine; 337:1584-1590 (1997)

STEURER, M.; KERN, J.; ZITT, M.; AMBERGER, A.; BAUER, M.; GASTL, G.; UNTERGASSER, G.; GUNSILIUS, E.; "Quantification of circulating endothelial and progenitor cells: comparison of quantitative PCR and four –channel flow cytometry"; BMC Research Notes; 1:71 (2008)

STRIJBOS, M.; KRAAN, J.; BAKKER, M.; LAMBRECHT, B.; SLEIJFER, S.; GRATAMA, J.; "Cells Meeting Our Immunophenotypic Criteria of Endothelial Cells are Large Platelets"; Cytometry, Part B, Clinical Cytometry; 72 (5): 86-93 (2007)

STRIJBOS, M.; GRATAMA, J.; KRAAN, J.; LAMERS, C.; BAKKER, M.; SLEIJFER, S.; "Circulating endothelial cells in oncology: pitfalls and promises"; British Journal of Cancer; 98: 1731-1735 (2008)

SULLIVAN, V.; HAWLEY, A.; FARRIS, D.; KNIPP, B.; VARGA, A.; WROBLESKI, S.; THANAPRON, P.; EAGLETON, M.; MYERS, D.; FOWLKES, J.; WAKEFIELD, T;

“Decrease in fibrin content of venous thrombi in selectin-deficient mice”; *Journal of Surgery Research*; 109:1-7 (2003)

SWERLICK, R.; LEE, K.; WICK, T.; LAWLEY, T.; “Human Derman Microvascular Endothelial But Not Human Umbilical vein Endothelial Cells Express CD36 In Vivo And In vitro”; *The Journal of Immunology*; 148:78-83 (1992)

TSAKADZE, N.; ZHAO, Z.; D’SOUZA, S.; “Interactions of Intercellular Adhesion Molecule-1 with Fibrinogen”; *Trends in Cardiovascular Medicine*; 12:101-108 (2002)

TEFFERI, A.; SOLBERG, L.; SILVERSTEIN, M.; “A Clinical Update in Polycythemia Vera and Essential Thrombocythemia”; *The American Journal of Medicine*; 109:141-149 (2000)

TEFFERI, A.; THIELE, J.; KVASNICKA, H.; BARBUI, T.; HANSON, C.; BAROSSO, G.; VERSTOVSEK, S.; BIRGEGARD, G.; MESA, R.; REILLY, J.; GISSLINGER, H.; VANNUCCHI, A.; CERVANTES, F.; FINAZZI, G.; HOFFMAN, R.; GILLILAND, G.; BLOOMFIELDS, C.; VARDIMAN, J.; “Proposals and rationae foe revision of the World Health Organization diagnostic criteria for polycythemia vera, essential thrombocythemia, and primary myelofibrosis: recommendations from an ad hoc international expert panel”; *Blood*; 110: 1092-1097 (2007)

THOMAS, D.; “Overview of venous thrombogenesis”; *Seminars in Thrombosis and Haemostasis*; 14:1-8 (1988)

THOMPSON; E.; SALEM, H.; “Inhibition of human thrombomodulin of factor Xa mediated cleavage of prothrombin”; *Journal of Clinical Investigation*; 78:13-17 (1986)

TIIRIKAINEN, M.; “Evaluation of Red Blood Cell Lysing Solutions for the Detection of Intracellular Antigens by Flow Cytometry”; *Cytometry*; 20: 341-348 (1995)

TRAPPENBURG, M.; SCHILFGAARDE; MARCHETTI, M.; SPRONK, H.; CATE, H.; LEYTE, A.; TERPSTRA, W.; FALANGA, A.; “ELEVATED PROCOAGULANT MICROPARTICLES EXPRESSING ENDOTHELIAL AND PLATELET MARKERS IN ESSENCIAL THROMBOCYTHEMIA”; *Haematologica*; 94: 911-918 (2009)

TRELINSKI, J.; WIERZBOWSKA, A.; KRAWCZYNSKA, A.; SAKOWICZ, A.; PEITRUCHA, T.; SMOLEWSKI, P.; ROBAK, T.; CHOJNOWSKI, K.; “Circulating endothelial cells in essential thrombocythemia and polycythemia vera: correlation with JAK2-V617F mutational status, angiogenic factors and coagulation activation markers”; *International Journal of Hematology*; Epub ahead of print (2010)

TRIPLETT, D.; “Coagulation and Bleeding Disorders: Review and Update”; *Clinical Chemistry*; 46(8B):1260-1269 (2000)

VAJKOCZY, P.; BLUM, S.; LAMPARTER, M.; MAILHAMMER, R.; ERBER, R.; ENGELHARDT, B.; VESTWEBER, D.; HATZOPOULOS, A.; “Multistep Nature of Microvascular Recruitment of Ex vivo-expanded Embryonic Endothelila Progenitor Cells during Tumor Angiogenesis”; *The Journal of Experimental Medicine*; 197 (12): 1755-1765 (2003)

VANNUCHI, A.; “Jak2 Mutations and thrombosis in the Myeloproliferative Neoplasms”; *Current Hematologic Malignancy Reports*; 5:22-28 (2010)

- VARDIMAN, J.; HARRIS, N.; BRUNNING, R.; "The World Health Organization (WHO) classification of the myeloid neoplasms"; *Blood*; 100: 2292-2302 (2002)
- VUORTE, J.; JANSSON, S.; REPO, H.; "Evaluation of Red Blood Cell Lysing Solutions in the Study of Neutrophil Oxidative Burst by the DCFH Assay"; *Cytometry*; 43:290-296 (2001)
- WANG, J.; HUANG, C.; WEI, X.; QI, D.; GONG, L.; MU, H.; YAO, Q.; "Changes of activated circulating endothelial cells and surviving in patients with non-small cell lung cancer after antiangiogenesis therapy"; *Chinese Medical Journal*; 121 (22):2234-2240 (2008)
- WASSMANN, S.; WERNER, N.; CZECH, T.; NICKENING, G.; "Improvement of Endothelial Function by Systemic Transfusion Of Vascular Progenitor Cells"; *Circulation Research*; 99:e74-e83 (2006)
- WAUTIER, M.; NEMER, W.; GANE, P.; RAIN, J.; CARTRON, J.; COLIN, Y.; KIM, C.; WAUTIER, J.; "Increased adhesion to endothelial cells of erythrocytes from patients with polycythemia vera is mediated by lamin $\alpha 5$ chain and Lu/BCAM"; *Blood*, 110:894-901 (2007)
- WESTLIN, W.; GIMBRONE, M.; "Neutrophil-Mediated Damage to Human Vascular Endothelium. Role of cytokine activation"; *American Journal of Pathology*; 142: 117-128 (1993)
- WHITE, R.; "Epidemiology of Venous Thromboembolism"; *Circulation*; 107: I-4 – I-8 (2003)
- WIERZBOWSKA, A.; ROBAT, T.; KRAWCZYNSKA, A.; PLUTA, A.; CEBULA, B.; SMOLEWSKI, P.; "Circulating endothelial cells in patients with acute myeloid leukemia"; *European Journal of Haematology*; 75:492-497 (2005)
- WIERZBOWSKA, A.; ROBAK, T.; KRAWCZYNSKA, A.; PLUTA, A.; WRZESIEN-KUS, A.; CEBULA, B.; ROBAK, E.; SMOLEWSKI, P.; "Kinetics and apoptotic profile of circulating endothelial cells as prognostic factors for induction treatment failure in newly diagnosed acute myeloid leukemia patients"; *Annals of Hematology*; 87:97-106 (2008)
- WOYWODT, A.; BLANN, A.; KIRSCH, T.; ERDBRUEGGER, U.; BANZET, N.; HAUBITZ, M.; DIGNAT-GEORGE, F.; "Isolation and enumeration of circulating endothelial cells by immunomagnetic isolation: proposal of a definition and a consensus protocol"; *Journal of Thrombosis and Haemostasis*; 4: 671-677 (2006)
- WOYWODT, A.; STREIBER, F.; GROOT, K.; "Circulating endothelial cells as marker for ANCA-associated small-vessel vasculites"; *Lancet*; 361:206-210 (2003)
- WU, K.; THIAGARAJAN, P.; "Role of endothelium in thrombosis and hemostasis"; *Annual Reviews of Medicine*; 47:315-331 (1996)

10. CIBERGRAFIA

http://www.invitrogen.com/site/us/en/home/Products-and-Services/Applications/Cell-Culture/primary_cell_culture/PCC-Misc/vascular-biology.html

ANEXO

Estudos de investigação Modelo de Consentimento Informado

CONSENTIMENTO INFORMADO PARA CONTROLOS

“Avaliação das Células Endoteliais em patologias que comprometem a integridade do endotélio”

Eu, abaixo-assinado _____, fui informado de que o estudo de investigação acima mencionado se destina a estudar as células endoteliais existentes no sangue periférico. Estas células são raras em indivíduos saudáveis, mas que em situação de doença podem aumentar em número e revelar a existência de lesão endotelial. Este estudo pretende avaliar se as células endoteliais podem ser um potencial marcador de diagnóstico da integridade vascular nos processos trombóticos. Sei que neste estudo vou fazer parte de um grupo de indivíduos controlo que vai ser comparado outros grupos de doentes que têm tromboembolismo venoso, síndrome mieloproliferativo e leucemia linfocítica crónica.

Sei que neste estudo está prevista a realização de análises, sendo colhida apenas uma amostra de sangue periférico para um a dois tubos de hemograma. Sei que o meu sangue vai ser analisado para estudarem as células endoteliais.

Foi-me garantido que todos os dados relativos à identificação dos participantes neste estudo são confidenciais e que será mantido o anonimato.

Sei que posso recusar-me a participar ou interromper, a qualquer momento, a participação no estudo, sem nenhum tipo de penalização por este facto.

Compreendi a informação que me foi dada, tive oportunidade de fazer perguntas e as minhas dúvidas foram esclarecidas.

Aceito participar de livre vontade no estudo acima mencionado. Concordo que seja efectuada a colheita de amostras de sangue para realizar as análises que fazem parte deste estudo. Também autorizo a divulgação dos resultados obtidos no meio científico, garantindo o anonimato.

Nome do participante no estudo: _____

Assinatura _____ Data [/ /]

Nº de Dador: _____ Telefone: _____

Nome do médico responsável _____
Assinatura: _____ Data [/ /]



Estudos de investigação Modelo de Consentimento Informado

CONSENTIMENTO INFORMADO PARA DOENTES

“Avaliação das Células Endoteliais No Tromboembolismo Venoso”

Eu, abaixo-assinado _____, fui informado de que o estudo de investigação acima mencionado se destina a estudar as células endoteliais existentes no sangue periférico. Estas células são raras em indivíduos saudáveis, mas que em situação de doença podem aumentar em número e revelar a existência de lesão endotelial. Este estudo pretende avaliar se as células endoteliais podem ser um potencial marcador de diagnóstico da integridade vascular nos processos trombóticos.

Sei que neste estudo está prevista a realização de análises e recolha de dados do meu processo. Sei que será feita apenas uma colheita de uma amostra de sangue periférico para um a dois tubos de hemograma. Sei que o meu sangue vai ser analisado para estudarem as células endoteliais.

Foi-me garantido que todos os dados relativos à identificação dos participantes neste estudo são confidenciais e que será mantido o anonimato.

Sei que posso recusar-me a participar ou interromper a qualquer momento a participação no estudo, sem nenhum tipo de penalização por este facto.

Compreendi a informação que me foi dada, tive oportunidade de fazer perguntas e as minhas dúvidas foram esclarecidas.

Aceito participar de livre vontade no estudo acima mencionado. Concordo que seja efectuada a colheita de amostras de sangue para realizar as análises que fazem parte deste estudo. Também autorizo a divulgação dos resultados obtidos no meio científico, garantindo o anonimato.

Nome do participante no estudo: _____

Assinatura _____ Data [/ /]

Nº do processo hospitalar: _____ Telefone: _____

Nome do médico responsável _____

Assinatura: _____ Data [/ /]

“Avaliação das Células Endoteliais no Tromboembolismo Venoso”

Informação ao Participante

As células endoteliais são muito importantes na manutenção da integridade vascular, estando localizadas entre o tecido vascular e o sangue. Em indivíduos saudáveis é raro encontrar células endoteliais no sangue periférico. No entanto, em determinadas doenças estas células podem aumentar em número e revelar a existência de lesão endotelial vascular, o que poderá conduzir ao desenvolvimento de tromboembolismos.

Este estudo consiste em determinar se as células endoteliais que existem no sangue periférico têm elevado potencial como marcador de diagnóstico da integridade vascular nos processos trombóticos. Para isto vai-se estudar as células endoteliais que existem num grupo de indivíduos saudáveis e num grupo de doentes com tromboembolismo venoso.

Para a realização deste estudo é apenas necessário colher sangue periférico para um a dois tubos de hemograma uma única vez, não implicando qualquer risco para o participante. O sangue, depois de colhido, será enviado para o laboratório, para se estudar e quantificar as células endoteliais que existam na amostra.

Ao participar neste estudo estará a contribuir para o desenvolvimento de um método que poderá auxiliar no diagnóstico do estudo da integridade vascular nos processos trombóticos.

Muito grata pela participação

(A investigadora Cláudia Torres)

FORMULÁRIO PARA REGISTO DE DADOS CLÍNICOS

Nome: _____ Nº Amostra: _____

Data de Nascimento: _____ Sexo: F M Data e hora da colheita: ___/___/___; _____

Informação Clínica: _____

Ultimo episódio trombótico ocorreu à _____ Nº de trombozes: _____

Deixou tratamento hipocoagulante à: _____ Medicação em curso: _____

História Familiar: Não Sim (especificar) _____

Apresenta mutação (assinalar opção se afirmativo).

Factor V Leiden

MTRHFR 677 C→G

Protrombina

PAI 4G/5G

20210 G→A

HPA-1a/1b

Tipo de Tromboembolismo (assinalar opção):

Venoso

- Seios venosos centrais
 Trombose venosa profunda dos membros
 Embolia pulmonar
 Veia cava
 Mesentérica

Arterial

- Enfarte cerebral
 AIT
 Trombose arterial periférica
 Enfarte agudo do miocárdio

Factores de risco trombótico (assinalar opção):

Após cirurgia

Hipertensão

Cardiopatia

Estrogénios

Diabetes

Dislipidémia

Tabagismo

História familiar

Doença Oncológica: _____

Resultados obtidos para:

VGM : _____ (mm³)

TT: _____ seg

D-Dímeros: _____ µg/mL

B₂GPI IgG: _____

Plaquetas: _____ (/mm³)

TR: _____

L.A. : _____

B₂GPI IgM: _____

PTT: _____ seg

Fibrinogénio: _____ g/L

ACA IgG: _____

Prot S: _____ %

TP: _____ seg

VIII_c: _____ %

ACA IgM: _____

Prot C: _____ %

Plasminogénio: _____ %

Homocisteína _____ µmol/L

RPCa: _____

AT: _____ %