



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA**

DISSERTAÇÃO

ELIANE SILVA DE SOUZA

**AVALIAÇÃO DOS ASPECTOS IMUNOBIOLÓGICOS DAS
CÉLULAS PROGENITORAS ENDOTELIAIS NA ANEMIA
FALCIFORME**

Salvador – Bahia

2011

ELIANE SILVA DE SOUZA

**AVALIAÇÃO DOS ASPECTOS IMUNOBIOLOGICOS DAS
CÉLULAS PROGENITORAS ENDOTELIAIS NA ANEMIA
FALCIFORME**

Dissertação de mestrado submetida ao Programa de Pós-graduação em Imunologia do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia como pré-requisito para obtenção do título de mestre em imunologia.

Orientadora: Prof^a Songeli Menezes Freire

Co-orientador: Prof. Vitor Antonio Fortuna

Salvador – Bahia

2011

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Universitária de Saúde,
SIBI - UFBA.

S729 Souza, Eliane Silva de
Avaliação dos aspectos imunobiológicos das células progenitoras endoteliais na anemia falciforme/ Eliane Silva de Souza. – Salvador, 2011.
119 f.
Orientadora: Profª Drª Songeli Menezes Freire.
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal da Bahia.
Instituto de Ciências da Saúde.

1. Anemia Falciforme. 2. Células. 3. Osteonecrose. I. Freire, Songeli Menezes. II. Universidade Federal da Bahia. III. Título.

CDU 616.15



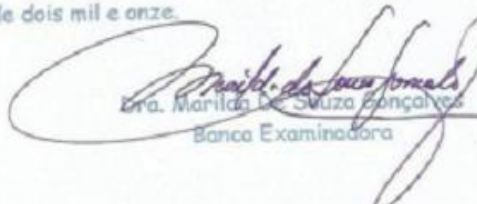
UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA



"ATA DA SESSÃO PÚBLICA DO COLEGIADO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM IMUNOLOGIA PARA JULGAMENTO DA DEFESA PÚBLICA DA DISSERTAÇÃO
DA MESTRANDA ELIANE SILVA DE SOUZA."

Aos vinte e dois dias do mês de dezembro do ano de dois mil e onze, às 08 horas no auditório III no 2º andar do Instituto de Ciências da Saúde, a Banca Examinadora composta dos Professores: Dra. Songeli Menezes Freire Orientadora, Dr. Vitor Antônio Fortuna Co-orientador, Dra. Marilda De Souza Gonçalves, Dra. Cynara Gomes Barbosa. Se reúne com a finalidade de discutir, avaliar e julgar o trabalho de Dissertação intitulada: "Avaliação dos aspectos imunobiológicos das células progenitoras endoteliais na anemia falciforme" da Pós-graduanda ELIANE SILVA DE SOUZA. Após a apresentação, foram feitos os comentários pelos examinadores. Havendo cumprido as exigências para a defesa, a Banca Examinadora conclui que a pós-graduanda teve a sua defesa de Dissertação APROVA 99, emitindo pareceres individuais que serão anexados à ata. Nada mais havendo a tratar, é encerrada a sessão, da qual é lavrada a presente ata que após lida e aprovada vai assinada pelas componentes da Banca examinadora, pela Mestranda e pela Vice-Coordenadora do Programa de Pós-Graduação. Salvador, vinte e dois de dezembro do ano de dois mil e onze.


Dra. Songeli Menezes Freire
Orientadora


Dra. Marilda De Souza Gonçalves
Banca Examinadora


Dr. Vitor Antônio Fortuna
Co-orientador


Dra. Cynara Gomes Barbosa
Banca Examinadora


Eliane Silva de Souza
Mestranda


Profa. Dra. Silvia Lima Costa
Vice-Coordenadora do PPGIm
ICS - UFBA

FONTES DE FINANCIAMENTO

- CNPq – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
- FAPESB – Fundação de Ampara à Pesquisa da Bahia

Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão
uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe
faltasse uma gota

Madre Tereza de Calcutá

AGRADECIMENTOS

A Deus por ter me dado a oportunidade de desenvolver esse trabalho e nunca ter se afastado do meu lado nas horas mais difíceis e a Nossa Senhora por ter permanecido comigo em todos os momentos.

Ao professor Vitor Fortuna, minha profunda gratidão, por ter confiado a mim este projeto, pelos ensinamentos, pela paciência, e pela oportunidade de participar de um grupo que me fez a cada dia acreditar que a pesquisa científica e seus avanços podem chegar verdadeiramente à aqueles que mais precisam.

À professora Songeli, exemplo de ética, dedicação, que sempre confiou neste trabalho e não mediu esforços para que o mesmo fosse concluído com êxito. Pelo entusiasmo e por estar sempre ao meu lado sempre.

Ao professor Roberto Meyer, exemplo de amor ao trabalho que faz, dedicação, humildade e serenidade, por ter permitido nossa inserção ao seu grupo e nos ensinar os princípios “do ajudar e do cuidar” sobretudo daqueles que mais precisam.

Ao professor Gildásio Daltro, pelo exemplo de perseverança, dedicação, humildade e profunda sensibilidade com a doença falciforme, por acreditar em meu trabalho desde o início e me incentivar a nunca desistir.

À professora Fabiana Paim, pela compreensão, e apoio em todos os momentos.

A toda coordenação do LABIMUNO e funcionários de modo especial D. Xica e Luziene que fizeram dessa caminhada, durante esses anos, muito mais agradável e feliz.

Aos meus amigos do LABIMUNO de modo especial a Marcela, uma irmã que Deus, generosamente, me concedeu e que esteve ao meu lado em todos os momentos. A Marivaldo, mais que um amigo, um irmão, companheiro fiel de todas as horas. A Rosa, uma amiga, companheira, sempre disposta a nos ajudar sempre esbanjando alegria. A Queliene e William, anjos de Deus na minha vida que estiveram sempre dispostos a ajudar. A Geraldo, um amigo e companheiro pelo auxílio para o desenvolvimento desse trabalho

À Secretaria do PPGIm, de modo especial a Dilcéia e D. Sônia, pela atenção, dedicação e compreensão.

A toda equipe do Com- HUPES, a D. Rita, D. Ana, Cludinéia, Gabriela pela atenção de disponibilidade e toda a equipe da ortopedia pela colaboração.

A toda e equipe do Banco de Sangue/ HUPES, de modo especial a Dr. Maurício Chaves por todo o apoio a esse trabalho.

A toda equipe do IPERBA, especialmente às enfermeiras Ana Laura e Ana Carla por todo o apoio ao projeto.

A toda a equipe do NUCEL na USP, de modo muito especial a professora Mari Sogayar, Ana Claudia e Cristiane pela acolhida no laboratório, pelo apoio ao projeto e pela oportunidade de poder aprofundar mais os meus conhecimentos.

A todo o grupo da professora Marilda Gonçalves pelo apoio, incentivo e atenção.

Aos pacientes que mais do que forneceram o material biológico para essa pesquisa, mas me concederam ensinamentos inestimáveis prá toda a minha vida.

À minha família, minha mãe Ivanete, minha tia/mãe Iorleide, meus irmãos Elaine (gêmea) e Luiz Henrique pelo apoio, compreensão, paciência e amor sempre.

À minha segunda família a comunidade Nossa Senhora do Resgate, de modo especial a padre Paulo Avelino, padre Arenilton Vilarindo e Fred pelas orações, amizade e orientações.

A todos aqueles que contribuíram direta ou indiretamente, mas que não foram citados nominalmente para o desenvolvimento desse projeto.

RESUMO

AVALIAÇÃO DOS ASPECTOS IMUNOBIOLÓGICOS DAS CÉLULAS PROGENITORAS ENDOTELIAIS NA ANEMIA FALCIFORME. ELIANE SILVA DE SOUZA

As Células Progenitoras Endoteliais (CPEs) são células liberadas na circulação potencialmente envolvidas na neovascularização de tecidos isquêmicos. A anemia falciforme é caracterizada pela oclusão microvascular, vasculopatia e inflamação crônica. Neste estudo avaliamos o número e as propriedades funcionais das CPEs de sangue periférico (n=28) e medula óssea (n=10) de pacientes falciformes. Voluntários, clinicamente estáveis com anemia falciforme e oito controles saudáveis foram recrutados como aprovado pelo comitê de ética. CPEs foram quantificadas por citometria de fluxo, isoladas e cultivadas em condições angiogênicas. Ensaio in vitro e de imunofluorescência foram realizados para avaliar a sua capacidade angiogênica e migratória e perfil molecular. As análises de citometria mostraram uma alta frequência de células CD34+/KDR+/CD45-/low e CD34+/KDR+/CD133+ na medula óssea de pacientes falciformes. As análises de citocinas revelaram níveis elevados de TGF β e VEGF na maioria dos pacientes falciformes, enquanto os níveis de TNF e SDF-1 α não apresentaram diferenças consideráveis. As CPEs de MO mostraram capacidade proliferativa e alta aderência em gel de colágeno, expressaram marcadores de células estromais e subendoteliais e os marcadores de células endoteliais, confirmados pela análise de RT-PCR. As CPEs de MO apresentaram capacidade migratória frente aos estímulos angiogênicos. O aumento da frequência na circulação de progenitores hematopoiéticos e endoteliais parece estar relacionado com estresse hematopoiético encontrado nos pacientes falciformes. A caracterização molecular das CPEs da medula óssea revelou uma possível origem de um progenitor em fase de transição mesenquimal/endotelial, sendo uma importante ferramenta para a medicina regenerativa vascular para pacientes falciformes.

Palavras chaves: Anemia falciforme, Células progenitoras endoteliais, osteonecrose.

ABSTRACT

IMMUNOBIOLOGICAL ASPECTS OF ENDOTHELIAL PROGENITOR CELLS IN SICKLE CELL ANEMIA. ELIANE SILVA DE SOUZA

Endothelial progenitor cells (EPCs) are a cell population released into circulation potentially involved in neovascularization of ischemic tissues. Sickle Cell Anemia (SCA) is characterized by microvascular occlusion, vasculopathy and chronic inflammation. We have reported autologous bone marrow grafting as a successful treatment of osteonecrosis in SCA, however the mechanism of this therapy is unknown. In this study, we evaluated the number and functional properties of EPCs in peripheral blood (PB) (n=28) and bone-marrow (BM) (n=10). Clinically stable volunteers with sickle cell anemia and healthy control subjects were recruited as approved by the human-subjects review board. EPCs were quantified by flow cytometry, isolated and cultured under angiogenic conditions. In vitro cellular assays and immunofluorescence were performed to determine their angiogenic and migratory capacity and molecular profile. The cytometry analyses showed an increased number of CD34+/KDR+/CD45- and CD133+/CD34+/KDR+ cells in PB and BM of SCA. The analysis of cytokines revealed elevated levels of TGF- β and VEGF in most SCA patients while levels of SDF-1 α showed no differences. Sickle BM-EPCs and normal cord blood (CB)-EPCs showed high proliferative and adhesion capacity in collagen coat. Sickle BM-EPCs expressed markers of stromal cells and subendothelial cells, atypical, expressed markers of endothelial cells. The sickle BM-EPCs showed proliferative capacity in grip collagen coat, expressed markers of subendothelial, stromal and endothelial cells, confirmed by PCR analysis. They showed migratory capacity in presence angiogenic factors. The increased frequency of circulating hematopoietic and endothelial progenitors on sickle PB highlights the remarkable hematopoietic stress in peripheral blood SCA patients. The molecular characterization of sickle BM-EPCs revealed a possible origin of a progenitor mesenchymal/endothelial in transition being important tool for vascular regenerative medicine for SCA patients.

Key Words: Sickle cell anemia, endothelial progenitor cells, osteonecrosis

LISTA DE FIGURAS

		Pág.
Figura 1	Distribuição do gene S no Brasil. CAÇADO, 2007.	19
Figura 2	Modelo dos subfenótipos na doença falciforme. Adaptado de KATO, et al, 2007.	22
Figura 3	Equipamento Sepax (Biosafe, Eysins, Switzerland).	43
Figura 4	Procedimento de punção de medula óssea em pacientes com osteonecrose da cabeça do fêmur.	43
Figura 5	Separação manual das células mononucleares utilizando Ficoll-Paque.	44
Figura 6	Modelo esquemático da câmara de Boyden utilizada nos experimento de migração celular.	48
Figura 7	Estratégia de análise das subpopulações de células CD34 ⁺ /CD45 ⁺ (C) e CD34 ⁺ /KDR ⁺ /CD45 ^{low/-} (F). Na figura A foram selecionados eventos positivos para CD45 (R1). Dentro de R1 em B a população CD34 ⁺ foi selecionada (R2). Dentro de R1 e R2 em C foram selecionados eventos com baixa expressão (R3) e alta expressão de CD45 (R13) (população CD34 ⁺ /CD45 ⁺). Em F, foi realizada a da interseção das populações em R2, R3 e R5 e obtido uma população em R7, positivos para CD34 e KDR, representando a fração celular CD34 ⁺ /KDR ⁺ /CD45 ^{low/-} .	56
Figura 8	Frequência das subpopulações de células CD34 ⁺ /CD45 ⁺ (A), CD34 ⁺ /CD133 ⁺ (B), CD34 ⁺ /KDR ⁺ /CD133 ⁺ (C), CD34 ⁺ /KDR ⁺ /CD45 ^{low/-} (D), encontradas no sangue periférico e medula óssea de pacientes falciformes e no sangue de cordão umbilical de indivíduos normais. A barra erros representa a mediana dos valores obtidos (Sangue periférico n=28 , 20	68

pacientes HbSS e 8 controles, MO = 10 pacientes HbSS e 12 sangues de cordões umbilicais) (Mann-Whitney).

- Figura 9 Dosagem de TGF- β (A), TNF (B) SDF-1 α (C) e VEGF (D), no sangue periférico e medula óssea de pacientes falciformes e indivíduos normais por ELISA. A barra de erros representa a mediana dos valores obtidos (Mann-Whitney). 69
- Figura 10 Análise morfológica das CPEs derivadas de sangue de cordão umbilical após 7, 14 e 21 dias de cultivo e células da medula óssea após 7 e 10 dias de cultivo. A figura F representa as células derivadas do sangue periférico após 14 dias de cultivo (Objetiva 10X). 71
- Figura 11 Ensaio de proliferação utilizando contagem com azul de tripan em câmara de Neubauer das CPEs da medula óssea HbA (A) e falciforme (B) na presença de 10% plasma autólogo após 72h de incubação. 72
- Figura 12 Ensaio de invasão celular em câmara de Boyden modificada com células derivadas de medula óssea falciforme e normais após 24h de incubação com plasma normal (HbA) e falciforme (HbSS) (Objetiva 10x). 73
- Figura 13 Ensaio de invasão celular com células derivadas de medula óssea falciforme e normais após 24h de incubação com plasma normal (HbA) e falciforme (HbSS). O gráfico representa o número médio de células e a barra erros o desvio padrão encontrado. 74
- Figura 14 Ensaio de turgulogênese em matrigel utilizando células da medula óssea falciforme e CPEs de sangue de cordão umbilical (Objetiva de 10x). 75
- Figura 15 Marcação para CD31, VE-caderina, UEA-I, Fator de Von Willebrand, Vimentina e α -actina de músculo liso de células da medula óssea de pacientes falciforme e sangue de cordão umbilical. 79

- Figura 16 Marcação das células derivadas da medula óssea normal e falciforme e CPEs de cordão para VE-caderina (CD144), Fator de von Willebrand, CD31, vimentina. O núcleo das células foram corados com Iodeto de Propídio (PI). As CPEs de sangue de cordão foram submetidas a hipóxia e avaliada a expressão de CD31 e vimentina. 81
- Figura 17 Avaliação da expressão de CD31 (PECAM), KDR (VEGFR2), CD146 (MCAM), CD105 (Endogлина), CD29, CD90 e CD14 nas células derivadas da medula óssea falciforme e normal comparada a expressão nas CPEs de sangue de cordão umbilical por citometria de fluxo. Gráficos representativos 9 experimentos com medulas ósseas falciformes, 9 de pacientes normais e 5 de sangues de cordão umbilicais. . 84
- Figura 18 Expressão de CD31 (PECAM), KDR (VEGFR2), CD146 (MCAM), CD105 (Endogлина), CD29, CD90 e CD14 nas células derivadas da medula óssea falciforme e normal comparada a expressão nas CPEs de sangue de cordão umbilical pela avaliação do percentual de células marcadas com relação a autofluorescência através da análise de *Kolmogorov-Smirnov* (KS) (% de deslocamento). 85
- Figura 19 Amostra representativa, da comparação da expressão gênica relativa de amostra de células derivadas da medula óssea falciforme, comparada às células normais. 86

LISTA DE TABELAS

		Pág.
Tabela 1	Sequências dos primers utilizados nas reações de qRT-PCR.	54
Tabela 2	Relação dos kits de ELISA utilizados nas dosagens de citocinas.	56
Tabela 3	Relação dos dados hematológicos, bioquímicos e histórico clínico dos pacientes com anemia falciforme que foram submetidos a coleta de sangue periférico.	61
Tabela 4	Relação dos dados hematológicos, bioquímicos e evolução do quadro clínico dos pacientes com anemias falciformes e normais que foram submetidos ao implante de CMMOs. * ON= Osteonecrose, ** HU= Hidroxiuréia.	63
Tabela 5	Frequência das subpopulações de células CD34 ⁺ /CD45 ⁺ , CD34 ⁺ /CD133 ⁺ , CD34 ⁺ /KDR ⁺ /CD133 ⁺ e CD34 ⁺ /KDR ⁺ /CD45 ^{low/-} . Encontradas no sangue periférico de pacientes com anemia falciforme e indivíduos normais.	64
Tabela 6	Frequência das subpopulações de células CD34 ⁺ /CD45 ⁺ , CD34 ⁺ /CD133 ⁺ , CD34 ⁺ /KDR ⁺ /CD133 ⁺ e CD34 ⁺ /KDR ⁺ /CD45 ^{low/-} , encontradas na medula óssea de pacientes com anemia falciforme.	65
Tabela 7	Frequência das subpopulações de células CD34 ⁺ /CD45 ⁺ , CD34 ⁺ /CD133 ⁺ , CD34 ⁺ /KDR ⁺ /CD133 ⁺ e CD34 ⁺ /KDR ⁺ /CD45 ^{low/-} , encontradas no sangue de cordão umbilical de indivíduos normais.	65
Tabela 8	Nível de expressão gênica relativa dos genes HIF, KDR, ENG, SDF-1, THBS1 e MCAM em amostras dos pacientes falciformes HbSS com relação ao paciente HbA.	86

LISTA DE ABREVIATURAS

HbS	Hemoglobina S
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
HbF	Hemoglobina Fetal
CAR	Haplótipo Bantu (República Central Africana)
Ben	Haplótipo Benin
NO	Óxido nítrico
VCAM-1	Molécula de Adesão Celular Vascular 1
BCAM	Molécula de Adesão de Células Basais
PECAM	Molécula de Adesão de Células Endoteliais e Plaquetas
EROs	Espécies Reativas e Oxigênio
NF- κ B	Fator Nuclear Kappa B
IL-1	Interleucina 1
TNF	Fator de Necrose Tumoral
ICAM-1	Molécula de Adesão Intercelular 1
TGF- β	Transforming Growth Factor β
VEGF	Fator de Crescimento de Endotélio Vascular
ET-1	Endotelina 1
Ang	Angiopietina
CSF	Fator de Células-tronco
GM-CSF	Fator de Células-tronco Granulocítica Monocítica
BFU-E	Erythroid - Burst Forming Unit

tPA	Ativador de Plasminogênio Tecidual
MTHFR	Metilenotetrahidrofolato Redutase
SNP	Polimorfismo de Nucleotídeo Simples
BMP	Proteína Morfogenética Óssea (Bone Morphogenetic Protein)
fvW	Fator de von Willebrand
CPE	Célula Progenitora Endotelial
CMMO	Células Mononucleares da Medula Óssea
CFU-F	Unidade Formadora de Colônias Fibroblastóide
EPO	Eritropoietina
FGF	Fator de Crescimento de Fibroblasto
CTM	Célula Tronco Mesenquimal
INF	Intérferon
ECFC	Endothelial Colony Forming- Cells
OEC	Outgrowth Endothelial Cell
CFU-EC	Endothelial Cell Colony – Forming units
CTH	Célula Tronco Hematopoiética
CEC	Celula Endotelial Circulante
CAC	Célula Angiogênica Circulante
UEA-1	Ulex Europeus Agglutinin-1
VE-Caderina	Caderina do Endotélio Vascular
AGM	Região da aorta, Gônada e Mesonefro
Tie	Tirosina Kinase com Domínio Imunoglobulina

VEGFR	Receptor de VEGF
KDR	Receptor com Domínio Kinase
MAPC	Célula Multipotente da Medula Óssea
HIF	Fator Indutor de
SDF	Fator Derivado de Célula Estromal (Stromal cell-Derived Fator)
CXCR4	Receptor tipo 4 de quimiocina CXC
G-CSF	Fator de Célula Tronco Granulocítica
PlGF	Fator de Crescimento Placentário
MMP9	Metaloproteinase 9
NOS	Óxido Nítrico Sintase
c-KIT	Tirosina Kinase da Proteína Kit
MCAM	Molécula de Adesão de Melanoma
TLR4	Receptor Toll-Like 4
LPS	Lipopolissacarídeo
GPI	Glicofosfatidilinositol
MEC	Matriz Extracelular
HGF	Fator de Crescimento de Hepatócitos
MCP	Proteína Químioatraente para Monócitos
LDL	Lipoproteína de Baixa Densidade
IGF	Fator de Crescimento semelhante a Insulina
LES	Lupus Eritematoso Sistêmico
RA	Artrite Reumatóide

TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
CMF	Solução Salina Livre de Cálcio e Magnésio
BSS	Solução Salina Tamponada
FCS	Soro Fetal Bovino
EGM	Meio de Cultura de Crescimento Endotelial (Endothelial Growth Medium)
EBM	Meio de Cultura Basal de Crescimento Endotelial (Endothelial Basal Medium)
FITC	Isotiocianato de Fluoroceína
PE	Ficoeritrina
PerCP	Piridinín Chlorophyll Protein
DAPI	4',6'- Diamidino – 2- Phenilindole
PI	Iodeto de Propídio
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
ENG	Endoglina
THBS1	Trombospondina
ELISA	Ensaio Imunoenzimático Ligado a Enzima
ON	Osteonecrose
HU	Hidroxiuréia
MO	Medula Óssea
ASF	Fator de Escala de Área Total
KS	<i>Kolmogorov-Smirnov</i>

SUMÁRIO

	Pág
RESUMO	
ABSTRACT	
LISTA DE FIGURAS	
LISTA DE TABELAS	
LISTA DE ABREVIATURAS	
1. INTRODUÇÃO	20
1.1 Doença Falciforme: Aspectos Epidemiológicos	20
1.2 Doença Falciforme: Fisiopatologia	22
1.3 Doença Falciforme: Subfenótipos Clínicos	24
1.4 Doença Falciforme: Osteonecrose	25
Patofisiologia da Osteonecrose	26
Comprometimento Vascular na Osteonecrose	26
1.5 Doença Falciforme: Terapia Celular no tratamento da Osteonecrose	28
Terapia Celular Aspectos Gerais	28
Terapia Celular na Osteonecrose	29
Mecanismos Celulares Potencialmente Envolvidos na Terapia Celular	30
1.6 Células Progenitoras Endoteliais (CPEs)	32
Aspectos Históricos, Origem e Conceitos das CPEs	32
Mobilização e Caracterização Fenotípica das CPEs	34
Papel das CPEs no Processo de Neoangiogênese	38

CPEs nas Doenças	40
2. OBJETIVOS	42
2.1 Objetivo Geral	42
2.2 Objetivos Específicos	43
3. METODOLOGIA	43
3.1 Fluxograma	43
3.2 Casuística	43
3.3 Coleta e Processamento das CMMOs e do Sangue Periférico	44
3.4 Separação das Células Mononucleares do Sangue de Cordão Umbilical	46
3.5 Isolamento das Células Progenitoras Endoteliais (CPEs)	47
Cultivo e Subcultivo das CPEs	47
3.6 Quantificação da CPEs do Sangue Periférico e Medula Óssea por Citometria de Fluxo	47
Desenvolvimento da Estratégia de análise das subpopulações celulares	48
3.7 Imunocitoquímica e Observação em Microscópio de Imunofluorescência	52
3.8 Citometria de Fluxo para as CPEs Cultivadas	53
3.9 Avaliação da Expressão de Genes nas CPEs por PCR	54
Extração do RNA	54
Síntese de c-DNA	54
3.9 Ensaio de Angiogênese <i>in vitro</i>	57
3.10 Ensaio de Migração e Invasão em Câmara de Boyden Modificada	57
3.11 Dosagem de Citocinas no Plasma	58
3.12 Análise Estatística	59

4. RESULTADOS	59
4.1 Seleção dos Pacientes	59
4.2 Quantificação das CPEs por Citometria de Fluxo	66
4.3 Dosagem das Citocinas	70
4.4 Isolamento das CPEs e Avaliação Morfológica	71
4.5 Análise Funcional	73
Curva de Proliferação	73
Invasão celular	74
Tubulogênese	77
4.6 Caracterização Molecular: Imunocitoquímica	78
Microscopia de Fluorescência Convencional	81
4.7 Caracterização molecular das CPEs por Citometria de Fluxo	84
4.8 Análise de Expressão de Genes Marcadores CPEs: qRT-PCR	87
5. DISCUSSÃO	88
6. CONCLUSÕES	96
7. PERSPECTIVAS FUTURAS	96
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	97
ANEXOS	115

1. INTRODUÇÃO

A doença falciforme é uma desordem genética conhecida pela substituição pontual de um único nucleotídeo no códon 6 do gene da beta globina (GAG>GTG) levando a formação de uma hemoglobina anormal (HbS) (GONÇALVES *et al.*, 2003). Em baixas tensões de oxigênio a HbS se polimeriza formando polímeros de hemoglobina levando a deformação dos eritrócitos, evento essencialmente importante para fisiopatologia da doença (REES *et al.*, 2010; ORKIN AND HIGGIS, 2010). No entanto, esse conceito tem sido ampliado de modo que na atualidade a doença falciforme é entendida como uma desordem monogênica em vários tecidos e de modulação poligênica (NOLAN, *et al.*, 2006).

Essa desordem pode ser classificada como um conjunto de hemoglobinopatias que contém diferentes genótipos que causam síndromes clínicas características, das quais a forma mais comum é a anemia falciforme, a qual se refere a homozigose para alelo β^s (HbSS). Outros genótipos também apresentam ampla distribuição como a hemoglobinopatia SC, quando os indivíduos são simultaneamente heterozigotos para os alelos β^s e β^c e hemoglobinopatia S/ β -tal, quando β^s é co-herdado com o alelo da β -talassemia (REES *et al.*, 2010).

1.1 Doença Falciforme: Aspectos Epidemiológicos

A primeira descrição formalmente conhecida da doença falciforme foi feita pelo cardiologista James Harrick em 1910 em Chicago nos Estados Unidos. Um paciente foi atendido e monitorado por ele com sintomas do que hoje é conhecido como síndrome torácica aguda (SERJEANT, 2010). Dados da Universidade Federal da Bahia revelam, no entanto, uma descrição anterior a descoberta de Dr. Harrick, pelo médico Jessé Accioly e publicada em revista de circulação local, o que, atribui a ele o pioneirismo da descoberta da doença falciforme (FERRARI & AZEVEDO, 2007).

Atualmente é conhecido que a doença falciforme teve origem na África, contudo tem ampla distribuição mundial. Dois fatores têm sido descritos na literatura para explicar a distribuição global da doença, são eles: seleção de indivíduos que apresentavam vantagens de sobrevivência em regiões endêmicas de malária e fluxo migratório (PAGNIER *et al.*, 1984). Dados da literatura indicam uma forte correlação geográfica entre a prevalência do gene S na população e a incidência histórica da malária. Alguns estudos indicam que os indivíduos falciformes apresentam uma resistência parcial a malária por *Plasmodium Falciparum*, embora o mecanismo dessa proteção ainda não tenha sido bem elucidado. Geograficamente, a

doença falciforme teve origens independentes no continente africano e asiático, formando quatro haplótipos africanos (haplótipos Senegal, Benin, Bantu e Camarões) e um haplótipo asiático (haplótipo Árabe-Índia). Com o intenso fluxo migratório movido pelo tráfico de africanos houve uma disseminação global do gene S, que foi incorporado ao genoma de vários países (PAGNIER *et al.*, 1984; REES *et al.*, 2010).

No Brasil a doença falciforme é a doença genética mais prevalente, contudo distribui-se de forma heterogênea por todo o país. Desta forma, a prevalência da HbS é maior nas regiões norte e nordeste (6-10%) enquanto que nas regiões sul e sudeste a prevalência é menor (2-30%) (CANÇADO, 2007) (Figura 1). Estima-se a existência de mais de 2 milhões de portadores do gene HbS, no Brasil e mais de 800 mil pessoas com a forma homozigótica (ANVISA, 2002).

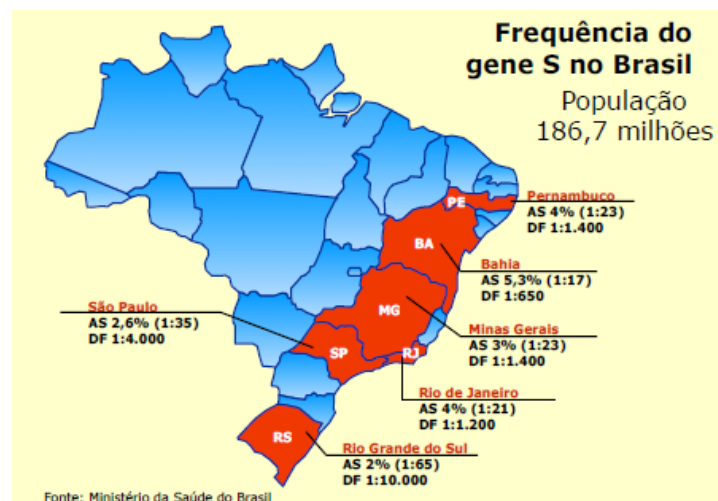


Figura 1. Distribuição do gene S no Brasil. CANÇADO, 2007.

A Bahia é um estado do nordeste brasileiro com uma população de cerca de 13 milhões e uma importante contribuição genética afro-descendente. A incidência de doentes falciformes na população em geral é estimada em 4% (CAÇADO, 2007). Um estudo feito com objetivo de avaliar a frequência do gene S entre os neonatos da cidade de Salvador, na Bahia observou que dos 590 recém nascidos que participaram do estudo cerca de 9,8% deles apresentaram o gene S (Traço falciforme), e 0,2% foram homozigotos para a doença (HbSS) (ADORNO *et al.*, 2005). A gravidade clínica da doença também está relacionada a vários fatores incluindo o tipo de haplótipo herdado e os níveis de hemoglobina fetal (HbF). A Bahia, estado com um dos maiores percentuais de mistura racial, sobretudo do componente africano, cerca de 85%, é conhecida por ter sido uma das principais rotas de tráfico de escravos africanos, principalmente da região central da África (predomínio do haplótipo Bantu, CAR) e da África

Ocidental (predomínio do haplótipo Benin, BEN). Segundo GONÇALVES e Col. (2003) foi observado uma frequência maior do haplótipo CAR/BEN entre os pacientes falciformes do que as formas homozigóticas. Esses achados foram correlacionados com níveis mais elevados de HbF, fator protetor da doença, entre os pacientes BEN/BEN. Outro achado importante foram os níveis de HbF, mediana, 7,3%, nos pacientes CAR/CAR, haplótipo mais grave da doença, uma vez que comumente são encontrados valores de mediana em torno de 5% (GONÇALVES *et al.*, 2003).

1.2 Doença Falciforme: Fisiopatologia

A fisiopatologia da anemia falciforme envolve uma miríade de eventos moleculares e celulares que culminará na manifestação tecidual e clínica da doença. Os eritrócitos que contém HbS, em baixas tensões de oxigênio, polimerizam-se, formando células rígidas e assumindo a forma falcizada. A polimerização de HbS desoxigenada leva ao rompimento de estruturas do citoesqueleto levando a exposição de fosfatidilserina, um fosfolípido que ativa fatores pró-coagulantes e pró- adesivos. Ela depende das concentrações intra-eritrocitárias de HbS e das concentrações intracelulares de hemoglobina fetal (HbF) (STUART & NAGEL, 2004; FRENETTE & ATWEH, 2007, REES *et al.*, 2010). Concentrações elevadas de HbF retardam o processo de polimerização da Hb, uma vez que ela não participa do polímero de Hb agindo dessa forma como um agente anti-polimerizante. Logo, as concentrações elevadas de HbF tem sido correlacionadas com taxas reduzidas de episódios dolorosos, úlceras de perna, osteonecrose, menos frequentemente com síndrome torácica aguda e gravidade da doença (ZAGO & PINTO, 2007; AKINSHEYE *et al.*, 2011). Os eritrócitos contendo os polímeros de HbS podem, sinergicamente, contribuir para a obstrução microcirculatória por prejudicar o trânsito capilar, levando as crises vaso-oclusivas e à injúria tecidual, que representam as principais moduladores dos eventos clínicos da anemia falciforme (STUART e NAGEL, 2004).

A etiologia da vaso-oclusão em pacientes falciformes não está completamente elucidada mas acredita-se existir o envolvimento de componentes celulares, interações anormais entre as células e fatores solúveis formando um verdadeiro ciclo (SCHNOG *et al.*, 2004). Esse ciclo se inicia com ativação endotelial que conduz ao aumento da adesão celular, que inicia-se com a polimerização de HbS, exposição de fosfatidilserina e expressão aumentada de diversas moléculas de adesão (STUART & NAGEL, 2004; OPKALA, 2004). Essas reações são

moduladas pela expressão elevada na superfície dos eritrócitos de integrinas $\alpha_4\beta_1$, B-CAM/Lu, CD36, CD47 e glicolipídios sulfatados, no endotélio de VCAM-1, fibronectina, laminina, trombospondina e integrinas $\alpha_v\beta_3$, nos leucócitos de CD11a, CD11b, β_2 integrina, PECAM-1, CD36, L-selectina, e CD162, e as interações com componentes da matriz como laminina, lactoferrina, elastase, CD-1 solúvel, trombospondina e fator de von Willebrand (fVW) (STEINBERG, 2005; STUART & NAGEL, 2004; OPKALA, 2004; ZAGO & PINTO, 2007). Associado a isso a alteração do tônus vascular devido a uma biodisponibilidade reduzida de NO e aumento de endotelina-1 e fatores pró-trombóticos leva a constrição vascular, favorecendo a vaso-oclusão. Após liberação do trombo formado, espécies reativas de oxigênio são levadas até a circulação provocando danos teciduais e inflamação, que novamente conduzirá a ativação endotelial (STEINBERG & BRUGNARA, 2003; STUART & NAGEL, 2004; MORRIS, 2008; SCHNOG *et al.*, 2004). LANARO e Col. (2009) observaram níveis elevados de IL-8 e TNF em pacientes com anemia falciforme quando comparados aos controles, contudo os níveis de IL-10, uma citocina anti-inflamatória, não apresentaram diferenças significantes com relação aos indivíduos normais. Outras citocinas como fator de crescimento endotelial (VEGF) e TGF- β também tem sido encontrados em níveis elevados em pacientes falciformes (SOLOVEY, *et al.*, 1999; MAKIS, *et al.*, 2000; DUIJS *et al.*, 2006).

A anemia falciforme também é caracterizada pelo intenso estresse hematopoiético. A hematopoiese é regulada por diversos fatores, mas, sobretudo pela ação de citocinas como GM-CSF, IL-3, Fator de célula-tronco (SCF) e TGF- β , anormalmente elevadas nos pacientes falciformes. Com base neste conceito, CROIZAT & NAGEL (1999), observaram níveis elevados destas citocinas no plasma dos pacientes com anemia falciforme, assim como BFU-E e transferrina solúvel, apresentando uma correlação inversa com os níveis de HbF. BFU-E constitui um tipo de colônia eritróide originada de uma célula precursora mais inicial, que normalmente não está presente na circulação sanguínea, ou é encontrada em quantidade pequena. A grande quantidade de BFU-E e transferrina na corrente sanguínea são fortes indícios de estresse eritróide. WU e Col. (2005), também observou o estresse eritropoiético através de uma análise de citometria de fluxo das células sanguíneas de pacientes falciformes que receberam transplante alogênico de células-tronco.

Em conclusão, as citocinas são importantes para a manutenção do fenótipo pró-trombótico e pró-inflamatório da anemia falciforme, sobretudo as citocinas IL-1 β , TNF- α , IL-6 e IL-8, ET-1 enquanto que VEGF pode ser essencial para a integridade celular.

1.3 Doença Falciforme: Subfenótipos clínicos

A doença falciforme é uma doença genética que pode apresentar uma diversidade de manifestações clínicas. Assim, um distúrbio monogênico no nível molecular, produz uma doença multifatorial quando considerado no contexto clínico, que se expressa por uma grande diversidade de fenótipos (ZAGO & PINTO, 2007). Recentemente estudos têm correlacionado dados da literatura acerca de dados bioquímicos, hematológicos e moleculares com a frequência de eventos clínicos da doença, sendo possível a partir desses dados subdividir clinicamente a doença em dois grandes subfenótipos como descrito na figura 2 (NOLAN *et al.*, 2006; KATO, *et al.*, 2007). Um subfenótipo relacionado a hemólise-disfunção endotelial, onde geralmente os pacientes apresentam uma frequência maior de complicações como hipertensão pulmonar, priapismo, úlcera de perna e acidente vascular cerebral (AVC) e o segundo subfenótipo relacionado a viscosidade sanguínea vaso-oclusão onde os pacientes comumente apresentam manifestações clínicas como crises dolorosas, síndrome torácica aguda e osteonecrose (KATO, *et al.*, 2007; MORRIS, 2008). Embora um número maior de evidências sejam necessários para descrição mais detalhada sobre os dois subfenótipos, a determinação de um perfil clínico para determinar os sintomas mais típicos entre os pacientes falciformes, é sem dúvida um método inovador que pode ajudar a direcionar terapias personalizadas para o subfenótipo específico (MORRIS, 2008).

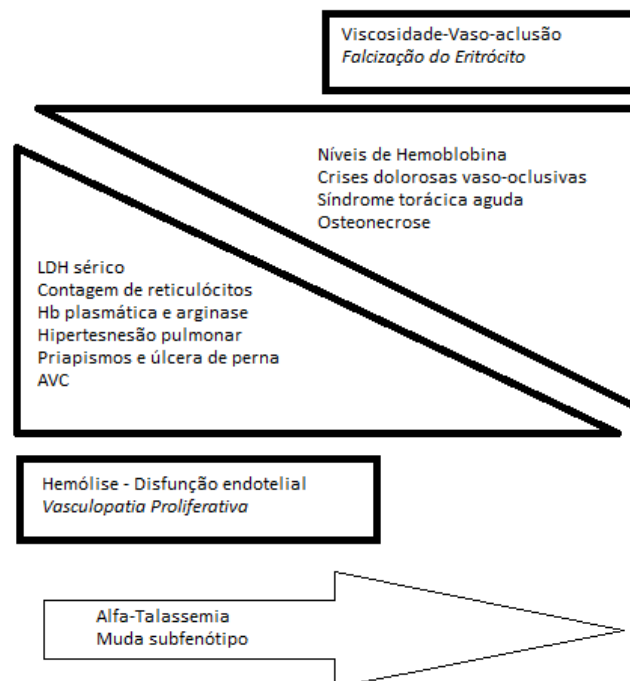


Figura 2. Modelo dos subfenótipos na doença falciforme. Adaptado de KATO, *et al.*, 2007.

1.4 Doença Falciforme: Osteonecrose

A necrose avascular da cabeça do fêmur é uma doença recalcitrante, caracterizada pela morte de osteócitos e da medula óssea. Embora seu mecanismo fisiopatológico ainda não esteja elucidado, as alterações parecem estar relacionadas ao inadequado suprimento sanguíneo no seguimento afetado do osso subcondral (MALIZOS *et al.*, 2007). Essa patologia afeta mais freqüentemente adultos na terceira ou quarta década de suas vidas. A incidência tem aumentado cada ano com cerca de 10.000 a 20.000 novos casos por ano nos EUA. Embora apenas um fêmur seja afetado, inicialmente, o comprometimento bilateral pode ser superior a 72% em dois anos (MUKISI-MUKASA *et al.*, 2010; MALIZOS *et al.*, 2007; MAHADEO *et al.*, 2011). A origem e os fatores de risco para o desenvolvimento da osteonecrose são diversos. Ela pode ser de origem idiopática ou associada a: trauma; de origem não-traumática; condições secundárias de hipercoagulação, alcoolismo, dislipidemia, síndromes mielodisplásicas e doenças autoimunes; doenças metabólicas; doenças do sistema alimentar; tabagismo; infecção HIV; doenças hematológicas (LAFFORGUE, 2006; MALIZOS *et al.*, 2007).

A osteonecrose da cabeça do fêmur é uma importante causa de morbidade na doença falciforme (WARE *et al.*, 1991; AKINYOOOLA *et al.*, 2009). Em pacientes com a doença falciforme a prevalência dessa doença pode chegar a 41% entre os indivíduos adultos e 27% em crianças. Ela é mais freqüente entre os pacientes homocigotos (HbSS) seguido dos pacientes com hemoglobinopatia SC (HbSC) (WARE *et al.*, 1991; MUKISI-MUKASA *et al.*, 2010; ALMEIDA & ROBERTS, 2005; HERNIGOU *et al.*, 2006; AKINYOOOLA *et al.*, 2009). O Curso da doença evolui de forma assintomática da grande maioria dos casos, progredindo para o colapso ósseo em 77% dos pacientes (HERNIGOU *et al.*, 2006). Nos casos não tratados, cerca de 87% das cabeças femorais afetadas evoluem mais rapidamente para o colapso em cerca de 5 anos após o primeiro diagnóstico (HERNIGOU *et al.*, 2003). Os sítios mais comuns de acometimento são: cabeça do fêmur, seguido da cabeça do úmero, joelho e das pequenas articulações da mão e pé, sendo que freqüentemente, tem se observado o comprometimento bilateral em mais de 50% dos casos (ALMEIDA & ROBERTS, 2005; HERNIGOU *et al.*, 2006). Em um estudo prospectivo avaliando a comprometimento multifocal da osteonecrose em doentes falciformes foi observado que 23% deles apresentaram necrose multifocal com acometimento do quadril em mais de 90% deles. Esse estudo revelou o elevado risco para o desenvolvimento de múltiplos sítios de comprometimento ósseo, que

evolui rapidamente, em cerca de 4 anos, e a importância do acompanhamento clínico e radiográfico desses pacientes (FLOUZAT-LACHANIETE *et al.*, 2009).

Fisiopatologia da Osteonecrose

Os mecanismos envolvidos na patogênese da osteonecrose em pacientes falciformes ainda não estão completamente elucidados, contudo parece existir uma ativação intravascular da coagulação durante as crises e níveis diminuídos de inibidores de coagulação. AKINYOOLA e Col. (2009) observaram uma atividade fibrinolítica deficiente em pacientes falciformes com osteonecrose, resultado de uma função diminuída do fator ativador de plasminogênio (tPA). O aumento do hematócrito e níveis de hemoglobina fetal reduzido nestes pacientes foram associados às crises vaso-oclusivas, os quais estão relacionados com a taxa elevada de falcização intravascular e viscosidade sanguínea, predispondo a necrose avascular da cabeça do fêmur (AKINYOOLA *et al.*, 2009; KATO *et al.*, 2007).

Análises de polimorfismos têm revelado a associação de alguns SNPs com o desenvolvimento da osteonecrose em pacientes falciformes. Alguns estudos têm demonstrado a presença do polimorfismo C677T no gene da MTHFR (metilenotetrahidrofolato redutase) como um importante fator de risco para complicações vasculares em pacientes falciformes (NETO *et al.*, 2006). Esse polimorfismo parece estar presente em complicações como retinopatia falciforme e osteonecrose (STEINBERG, 2005; NETO *et al.*, 2006). Além desse polimorfismo, alguns SNPs também têm sido identificados em alguns genes como (proteína morfogenética óssea (BMP6), TGFBR2, TGFBR3, endotelina-1(END1), ERG, KL, enzima conversora de endotelina-1 (ECE1) e anexina A2 (ANXA2) (BALDWIN *et al.*, 2005; STEINBERG, 2005; NOLAN *et al.*, 2006; ULUG *et al.*, 2009; ABHISHEK *et al.*, 2010).

Comprometimento Vascular na Osteonecrose e tratamento

A necrose avascular do fêmur parece estar relacionada a morte de osteócitos e um reparo anormal do tecido ósseo. Isso leva a um colapso da arquitetura da estrutura óssea da cabeça do fêmur levando a dor nas articulações e perda da função. Os vasos que transportam oxigênio e os nutrientes para as áreas do tecido ósseo são tortuosos e tem anastomoses limitadas. Uma deficiência na circulação devido a obstrução vascular pode levar a mudanças degenerativas do

tecido ósseo. O grau de degeneração e o reparo da lesão estão associados à extensão do comprometimento vascular e uma adequada circulação colateral (KERACHIAN *et al.*, 2006).

Alguns modelos experimentais têm sido desenvolvidos na tentativa de elucidar a cadeia de eventos que culminará na morte dos osteócitos na cabeça femoral. A epífise da cabeça do fêmur é o local particularmente afetado pelos danos isquêmicos por causa do seu suprimento com a circulação colateral. Quando essa circulação é obstruída no nível de artérias, veias, capilares ou sinusóides, a circulação nas artérias é interrompida (BEJAR *et al.*, 2005). A obstrução da circulação irá conduzir ao aporte sanguíneo inadequado e necrose óssea. Trabalhos com camundongos que apresentam osteonecrose têm demonstrado uma aumentada permeabilidade vascular associada com uma vascularização insuficiente e níveis baixos de células-tronco da medula óssea, acompanhada de uma expressão descontrolada de VEGF durante o processo de reparo inadequado (BEJAR *et al.*, 2005; ZHANG *et al.*, 2009; VAROGA *et al.*, 2009; WANG *et al.*, 2010). Outros fatores também podem estar relacionados ao desenvolvimento da necrose óssea. SÉGUI e Col. (2008) observaram uma expressão elevada de marcadores endoteliais, fator III e fvW entre os pacientes com osteonecrose, os quais não foram associados com inflamação ou trombofilia. Esses dados sustentam a hipótese de que a formação de trombos na microcirculação pode estar relacionada a ativação endotelial e não exatamente ao aumento de fatores pró-trombóticos (SÉGUI *et al.*, 2008).

A indefinição sobre a etimologia e o mecanismo fisiopatológico da necrose avascular tem prejudicado as proposições e alternativas para tratamento desta doença. O tratamento depende do grau de comprometimento da lesão óssea, o que está relacionado com a precocidade do diagnóstico (ANVISA, 2002; MALIZOS *et al.*, 2007). Nos casos iniciais onde a lesão osteoarticular ainda não foi estabelecida, a simples descompressão óssea pode ser indicada. A descompressão do centro da necrose, que visa diminuir a pressão venosa intra-óssea, descomprimir a cabeça femoral, restaurar o fluxo circulatório normal e reduzir a sensação de dor, embora este procedimento não impeça a evolução da osteonecrose (HERNIGOU *et al.*, 2008).

Trabalhos recentes descrevem que a osteonecrose está associada com uma diminuição no número de células osteoprogenitoras locais ou do estroma da medula óssea (mesenquimais) precursoras no local da lesão óssea (HERNIGOU *et al.*, 1999). HERNIGOU e Col. (1999) estão entre os primeiros a sugerir uma abordagem fisiopatológica de enxertar células-tronco

osteogênicas para regeneração da lesão necrótica e tratamento da osteonecrose. Além disto, há dados na literatura relacionando o número de Células Progenitoras Endoteliais Circulantes e o desenvolvimento da necrose avascular. Pacientes com osteonecrose não-traumática (corticóide-induzida, álcool-induzida ou idiopática) apresentaram o número de CPE circulantes reduzidas, e células funcionalmente deficientes, com a capacidade migratória reduzida e elevada senescência vascular, quando comparadas aos indivíduos controles (FENG *et al.*, 2009).

Apesar das novas alternativas terapêuticas no tratamento da osteonecrose, como a terapia celular, e de seus resultados satisfatórios, poucos dados são conhecidos sobre o mecanismo potencial desta terapia e as propriedades das células enxertadas na regeneração e/ou interrupção da progressão da osteonecrose no doente falciforme (HERNIGOU & BEAUJEAN, 2002; KARATOPRAK *et al.*, 2008; JONES *et al.*, 2008).

1.5 Doença Falciforme: Terapia Celular no Tratamento da Osteonecrose

Terapia Celular: Aspectos Gerais

A terapia celular utilizando células-tronco da medula óssea é uma prática utilizada a mais de 50 anos, pioneiramente para tratar doenças hematológicas. Nas últimas décadas essa prática tem aumentado, sobretudo utilizando células mononucleares da medula óssea (CMMOs) autólogas. A terapia utilizando as CMMOs autólogas tem sido desenvolvida em uma miríade de doenças isquêmicas de membros, doenças cardíacas e doenças ortopédicas (HIGASHI *et al.*, 2004; STRAUER *et al.*, 2008; SEGERS & LEE, 2008; ILIC & POLAK, 2011; TROUNSON *et al.*, 2011). A utilidade, viabilidade e relevância clínica da terapia celular visando o reparo das lesões isquêmicas foi claramente demonstrada, tanto em lesões agudas quanto em crônicas. Estudos pioneiros relataram o tratamento de isquemia de membros inferiores em pacientes diabéticos, com injeção de CMMOs ao longo do percurso dos vasos sanguíneos da região infra-poplíteia. A circulação colateral estabelecida em tempo curto permitiu a renovação da irrigação do membro, evitando a necrose e a amputação distal (TALTEISHI-YUYAMA *et al.*, 2002; HIGASHI *et al.*, 2004). No Brasil um trabalho pioneiro do grupo do Dr. Fernando Hans Dohmann da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ) na terapia utilizando CMMOS em pacientes com doenças cardíacas foi

desenvolvido com grande sucesso, a curto prazo, contudo a longo prazo novas avaliações precisam ser realizadas (PERIN *et al.*, 2003; DOHMANN *et al.*, 2005).

Terapia celular na Osteonecrose

A capacidade osteogênica das células da medula óssea tem sido descrita desde 1869 em camundongo e apenas em 1960 foi descrito o potencial das células-tronco da medula na regeneração óssea em humanos (HERNIGOU *et al.*, 2005). A convergência de três diferentes perspectivas no tratamento da osteonecrose resultou na exploração da terapia celular. Primeiro, a necessidade de desenvolver técnicas menos invasivas possíveis. Segundo, a partir do reconhecimento de que o tempo de reparo é diferente em lesões onde o tecido ainda permanece preservado e regiões colapsadas, foi imperativo o desenvolvimento de métodos que possibilitem o reparo. Por fim, reconhecendo que a capacidade de regeneração do tecido pode estar prejudicada devido a patologia, surgiu a necessidade de introduzir fatores que sejam capazes de suprir a capacidade regenerativa tecidual (JONES *et al.*, 2008). Diante disso, o transplante autólogo de CMMOs tem configurado como uma importante alternativa terapêutica para doenças ortopédicas. A injeção de CMMOs no local da osteonecrose em pacientes com estágios iniciais da doença (estágio I ou II) tem sido descrita na literatura (GANGJI & HAUZEUR, 2010). Um estudo clínico com nove pacientes com osteonecrose da cabeça do fêmur em estágios iniciais da doença revelou uma melhora clínica considerável dos pacientes, contudo são necessárias avaliações a longo prazo para inferências mais conclusivas acerca de seus benefícios (KARATOPRAK *et al.*, 2008). Um estudo prospectivo com pacientes com osteonecrose após o tratamento com a descompressão óssea e o implante autólogo das CMMOs demonstrou a diminuição da dor e a progressão da doença para o colapso ao longo de 17 anos de seguimento em 87% dos casos. Esses dados fornecem evidências importantes da efetividade da terapia celular em pacientes falciformes, após uma avaliação a longo prazo do tratamento (HERNIGOU *et al.*, 2008).

No Brasil um trabalho pioneiro desenvolvido no Complexo Hospitalar Universitário Professor Edgar Santos (C-HUPES) na Universidade Federal da Bahia (UFBA) tem oferecido a terapia celular para pacientes falciformes com necrose óssea avascular. Após a avaliação dos primeiros oito pacientes concluiu-se que o implante autólogo de células mononucleares da medula óssea no local da osteonecrose é seguro e eficaz no tratamento dos estágios iniciais da necrose da cabeça femoral desses pacientes, com resultados clínicos e radiológicos iniciais

promissores, contudo os mecanismos celulares que governam essa terapia ainda permanecem desconhecidos (DALTRO *et al.*, 2008).

Mecanismo Celulares Potencialmente Envolvidos na Terapia Celular

O sucesso da terapia celular está intrinsecamente relacionado com capacidade das células infundidas em se diferenciarem e regenerarem a tecido lesado, bem como estimular as demais células a proverem o reparo tecidual. O mecanismo desse tratamento ainda não é completamente conhecido, contudo o reparo da lesão mediado por células envolve criticamente a reconstituição do tecido lesado e a formação de novos vasos sanguíneos que devolvam ao tecido lesado o aporte sanguíneo necessário para o restabelecimento tecidual. A neovascularização pode ocorrer através de dois mecanismos: angiogênese e vasculogênese. Na angiogênese os vasos são formados a partir da rede vascular pré-existente, primariamente por brotamento de novos vasos. Esse processo é mediado pela proliferação das células endoteliais em condições de hipóxia ou inflamação. A hipóxia estimula a produção de fatores solúveis pró-angiogênicos com VEGF, EPO, FGF e angiopoietinas que vão agir sobre as células endoteliais e estimular proliferação, quimiotaxia e migração pela matriz extracelular (OTROCK *et al.*, 2007). Dentro desse contexto, uma variedade de tipos celulares como as células endoteliais, células-tronco mesenquimais (CTMs) e células hematopoiéticas participam desse processo por produzirem fatores solúveis precípuos para o desenvolvimento angiogênico como VEGF (MÜLLER *et al.*, 2008; SIEVEKING *et al.*, 2008). A vasculogênese é formação de novos vasos a partir de células progenitoras. Por muito tempo acreditou-se que esse processo era restrito ao desenvolvimento embrionário, contudo evidências recentes indicam a presença de progenitores no indivíduo pós-natal capazes de dar origem a novos vasos (ASAHARA *et al.*, 1997)

A medula óssea tem sido a principal fonte de células-tronco para a terapia celular, sobretudo para necrose avascular óssea. A cavidade medular é o nicho biológico de pelo menos três possíveis células-tronco, capazes de participar do mecanismo de reparo mediado por células na terapia celular, são elas: as células-tronco hematopoiéticas (CTHs), as CTMs e as CPEs (BEYTH *et al.*, 2011). A CTH é uma célula comprometida com a linhagem hematopoiética, ou seja, tem a habilidade de reconstituir todo o sistema hematopoiético. Existe uma relação importante entre esta célula e células osteoblásticas. (HERZOG *et al.*, 2003; SACCHETTI *et al.*, 2007; BIANCO, 2011). De acordo com a literatura os osteoblastos compartilham o

mesmo nicho biológico e tem o papel na regulação da função e do número das CTHs (SACCHETTI *et al.*, 2007; BIANCO, 2011).

Das três populações de células-tronco encontradas da medula óssea, a melhor caracterizada é a CTM. As CTMs são definidas minimamente como células aderentes ao plástico, quando submetidas em condições padrão de cultivo, que expressam CD105, CD73 e CD90 e não expressam CD45, CD34, CD14, CD19 e HLA-DR e são capazes de originar, *in vitro*, células do tecido conectivo como condrócitos, adipócitos e osteoblastos (OREFFO *et al.*, 2005; BIANCO *et al.*, 2010). Elas podem ser encontradas na medula óssea, tecido adiposo, pulpa dentária, placenta, cordão umbilical, fluido amniótico e distribuídas por todo o corpo na forma de pericitos. A diferenciação de CTM em células perivasculares é de importância potencial na medicina regenerativa vascular, visto que as células perivasculares formadas darão estabilidade aos vasos neoformados (OREFFO *et al.*, 2005; PHINNEY & PROCKOP, 2007; AU *et al.*, 2007; CAPLAN, 2009; BIANCO *et al.*, 2010).

1.6 Células Progenitoras Endoteliais (CPEs)

Aspectos Históricos, Conceitos e Origem das CPEs

A neovascularização pós-natal é o resultado da proliferação, migração e remodelagem de células endoteliais derivadas de vasos pré-existentes. (URBICH & DIMMELER, 2004; PRATER *et al.*, 2007; CHAO & HIRSCHI, 2010). Desde 1932 a existência de células angiogênicas em indivíduos adultos tem sido descrita na literatura. Estruturas semelhantes a capilares foram detectadas em culturas de leucócitos sanguíneos (RIBATTI, 2007; CHAO & HIRSCHI, 2010). Apenas em 1990 e baseado nos estudos seminais de Judah Folkman (1984) a neovascularização pós-natal foi proposta ocorrer por angiogênese através de células endoteliais circulantes (WATT *et al.*, 2010). Contudo em 1997 Asahara e colaboradores reportaram o isolamento da suposta CPE do sangue periférico humano, originada da medula óssea. ASAHARA e Col. (1997) observaram a presença de progenitores, possivelmente de origem hematopoiético, com potencial angiogênico que foram capazes de promover neoangiogênese *in vivo*. Este trabalho foi de grande importância, pois forneceu evidências acerca da existência de progenitores com papel vasculogênico em indivíduos adultos e abriu campo para novas questões relacionadas com a origem hematopoiética destas células (PRATER *et al.*, 2007).

Diversos estudos foram realizados a partir desses achados, contudo sem um padrão metodológico definido (PRATER *et al.*, 2007). INGRAM e Col. (2004), identificaram uma nova hierarquia das CPEs no sangue periférico e no sangue de cordão umbilical. As CPEs foram identificadas quanto ao seu potencial proliferativo, como células com baixo potencial proliferativo (Low Proliferative Potential - LPP-ECFC) ou altamente proliferativa (High Proliferative Potential - HPP-ECFC), sendo que a completa hierarquia foi identificada apenas no sangue de cordão umbilical. Este trabalho também forneceu importantes bases metodológicas para o isolamento das CPEs altamente proliferativas e que é utilizado até a atualidade (INGRAM *et al.*, 2004). Após o estabelecimento das bases metodológicas para o isolamento das CPEs, YODER e Col. (2007) desenvolveram uma análise clonal redefinindo o conceito desses progenitores, na tentativa de esclarecer a possível origem hematopoiéticas das diferentes populações de “CPEs” estudadas na literatura. Eles isolaram duas populações celulares distintas, as “Endothelial Colony Forming- Cells” ou ECFC, também conhecida na literatura como “Outgrowth Endothelial Cell” ou OECs e a outra de “Endothelial Cell Colony – Forming units” ou CFU-EC. As CFU-EC expressaram marcadores de células endoteliais e hematopoiéticas, apresentaram atividade fagocítica, não foram capazes de formar colônias secundárias *in vitro* e foram clonalmente relacionadas à mutação genética na CTH, sugerindo que estas células são derivadas de células hematopoiéticas da linhagem monocítica/macrofágica, o que não foi observado para as ECFC. Entretanto as ECFC apresentaram os marcadores células endoteliais, foram capazes de formar colônias secundárias *in vitro*, revelando seu elevado potencial proliferativo e formaram vasos *in vivo*. (LIN *et al.*, 2000; YODER *et al.*, 2007). Desta forma, dados da literatura indicam que as CFU-EC são células com potencial angiogênico de origem hematopoiética que estimulam a angiogênese, possivelmente através de mecanismos parácrinos. Enquanto que as OECs são progenitores de origem endotelial que são capazes de promover a vasculogênese (CASE *et al.*, 2007; TIMMERMANS *et al.*, 2007; SIEVEKING *et al.*, 2008; SHANTSILA *et al.*, 2008).

Diante disso, fez-se necessária uma definição mais detalhada acerca das células com potencial angiogênico. Na literatura tem sido descritas pelo menos três populações celulares. As células angiogênicas circulantes (Circulating Angiogenic Cells-CACs) ou endoteliais circulantes (CECs), que são células que possivelmente se descolam do endotélio lesado e são liberadas na circulação periférica e podem ser enriquecidas com monócitos/macrófagos. Estas células apresentam os marcadores de células endoteliais, a lectina *Ulex Europeus* Agglutinin-1 (UEA-1), fvW, CD31 (PECAM) VE-Caderina (CD144) e Tie-2 e KDR. Elas promovem a

neovascularização *in vivo*, estão relacionadas ao risco cardiovascular, contudo não são capazes de formar colônias secundárias *in vitro* (PRATER *et al.*, 2007; CRITSER & YODER, 2010). As CFU-EC, ou CFU de Hill, primeiro descritas por Asahara em 1997, representa uma pequena subpopulação da fração de células mononucleares, são também conhecidas como “early CPEs” porque são as primeiras CPEs emergem em cultura de 5-9 dias de cultivo e apresentam uma morfologia alongada. Estas células apresentam os marcadores de células endoteliais KDR, CD31, Tie-2, CD105, CD144, CD146, fvW, são capazes de ingerir LDL acetilado, também expressam CD14, CD115, perdem gradualmente em cultura a expressão de CD45, possuem atividade fagocítica e apresentam um efeito angiogênico parácrino (ASAHARA *et al.*, 1997; YODER *et al.*, 2007; PRATER *et al.*, 2007; SIEVEKING *et al.*, 2008; CRITSER & YODER, 2010). As ECFC ou OECs, descritas inicialmente por LIN e Col. (2000) tem sido amplamente estudadas, sendo consideradas na atualidade como as células mais próximas do que representaria uma CPE. Estas células apresentam morfologia típica das células endoteliais, em forma de paralelepípedo ou “cobblestone” e as primeiras colônias emergem em cultura de 10-21 dias de cultivo. As ECFCs apresentam os marcadores de células endoteliais, um potencial proliferativo elevado, são capazes de formar colônias secundárias *in vitro* e de formar estruturas semelhantes a túbulos *in vitro*, e quando injetadas *in vivo*, são incorporadas nos sítios ativos de neoangiogênese (INGRAM *et al.*, 2004; YODER *et al.*, 2007; PRATER *et al.*, 2007; SIEVEKING *et al.*, 2008; CRITSER & YODER, 2010).

A origem das CPEs é controversa e trabalhos da literatura depreendem uma origem hematopoiética, mesenquimal ou do próprio endotélio. O sistema hematopoiético e vascular se desenvolve em paralelo e de maneira interdependente durante a embriogênese. Ambas são originadas da mesma região no embrião, a região da aorta, gônada e mesonefro (AGM), suportando a hipótese da existência de precursor comum, o hemangioblasto. Evidências têm comprovado a origem de CTH do endotélio hemogênico durante o desenvolvimento embrionário, reforçando a hipótese do precursor comum, contudo desconhece-se se isso ocorre no indivíduo pós-natal (JAFFREDO *et al.*, 2005; BERTRAND *et al.*, 2010). A existência do hemangioblasto no indivíduo pós-natal tem sido sugerido por inúmeros trabalhos utilizando a caracterização fenotípica e estudos *in vitro* e *in vivo* de células endoteliais (SCHATTEMAN & AWAD, 2004; XIONG, 2008). De fato existe uma associação física entre a CTH e CPE na medula óssea pós-natal de modo que essas células compartilham algumas funções e marcadores de superfície celular como CD34, PECAM, Tie-1, Tie-2, VEGFR1 e fator de von Willebrand (SCHATTEMAN & AWAD, 2004; RIBATTI, 2007;

CHAO & HIRSCHI, 2010). Estudos revelam que células mielóides CD14 positivas, na presença de fatores angiogênicos exibem propriedades de células endoteliais como a expressão de KDR, CD105, fator de von Willebrand e VE-caderina. Além da expressão desses marcadores, essas células são capazes de integrar o endotélio em sítios ativos de neoangiogênese *in vivo* (CHAO & HIRSCHI, 2010; WATT *et al.*, 2010).

As CTMs são capazes de dar origem a células endoteliais *in vitro*. Estudos revelam que na presença de meio de cultura contendo VEGF essas células podem dar origem a uma população heterogênea de tipos celulares que exibem propriedade endotelial *in vitro* e melhoram a neovascularização *in vivo* (OSWALD *et al.*, 2004; CHAO & HIRSCHI, 2010). Outros estudos têm revelado que as CPEs podem ser originadas de células multipotentes da medula óssea (MAPC) ou do mesoangioblasto (COSSU & BIANCO, 2003; URBICH & DIMMELER, 2004; RIBATTI, 2007; CHAO & HIRSCHI, 2010). Devido a grande dificuldade de purificação da CPEs das CTMs da medula óssea, existe uma grande possibilidade de contaminação das culturas com CTMs (IAMAMURA *et al.*, 2010).

A hierarquia completa de ECFC tem sido encontrada na parede dos vasos, sugerindo que este pode representar o maior nicho pós-natal dessas células (INGRAM *et al.*, 2005; WATT *et al.*, 2010). Embora muitos estudos tenham sido desenvolvidos acerca da origem das CPEs, nenhuma evidência significativa tem sido encontrada na literatura que comprove a real origem (s) dessas células, de modo que mais estudos devem ser desenvolvidos para inferências mais conclusivas.

Mobilização e Caracterização Fenotípica das CPEs

De acordo com os estudos que sugerem a origem medular dessas células, após um estímulo isquêmico, as CPEs são mobilizadas no sangue periférico em direção aos sítios ativos de neoangiogênese (GALLAGHER *et al.*, 2007). Após o estímulo hipóxico, o fator transcricional NF- κ B é ativado, levando a ativação do fator indutor de hipóxia (HIF-1 α). A ativação do HIF levará ao aumento da expressão e liberação de VEGF, expressão de CXCR4 e liberação de SDF-1 α . A diferença de gradiente de SDF-1 α no sangue periférico/medula óssea estimulará a mobilização das CPEs (URBICH & DIMMELER, 2004; TOUSOULIS *et al.*, 2008; JIN *et al.*, 2008; YU *et al.*, 2009; TONGERS *et al.*, 2010). Além do VEGF e SDF outras proteínas participam desse processo como o G-SCF (Fator estimulador de colônias

granulocíticas) e PlGF (Fator de crescimento placentário) e as enzimas eNOS e metaloproteinases (MMP-9) (TOUSOULIS *et al.*, 2008; JIN *et al.*, 2008). Os progenitores da medula óssea fazem parte das células que compõe o estroma medular, elas estão ligadas ao estroma através do c-Kit. As MMP-9 irão agir clivando c-Kit e liberando o hemangioblasto, que, de acordo com gradiente de citocinas angiogênicas, se diferenciarão em CPEs e serão mobilizadas para o sangue periférico (HRISTOV *et al.*, 2003). A liberação de VEGF levará a ativação da NOS estromal que resultará no aumento dos níveis de NO na medula óssea. O aumento de NO levará a mobilização das CPEs dos nichos da cavidade medular para a circulação (GALLAGHER *et al.*, 2007).

Diante da grande discussão a cerca da verdadeira origem das CPEs a caracterização dessas células torna-se um instigante desafio. Na literatura, a caracterização molecular dessas células é comumente realizada através da expressão fenotípica de marcadores de células-tronco e de células endoteliais. De acordo com o local de origem dessas células e o cultivo celular elas apresentarão uma expressão diferenciada dos marcadores celulares (HRISTOV *et al.*, 2003; FADINI *et al.*, 2008). De acordo com a literatura não existe um marcador específico que identifique as CPEs, logo sua caracterização tem sido proposta utilizando diferentes marcadores celulares (TÁRNOK *et al.*, 2009). As células da medula óssea, não são muito estudadas devido a grande diversidade celular encontrada na medula óssea. Contudo, alguns estudos revelam que estas células expressam CD133, CD34, KDR (VEGFR2) e c-Kit e são negativas para os marcadores CD146, CD31, fvW, VE-caderina e CD14 e possuem uma baixa expressão de CD45 (HRISTOV *et al.*, 2003).

CD34 é uma sialomucina expressa em CTHs e no endotélio ativado. Essa proteína tem a função de molécula de adesão e mediar interações entre as células endoteliais e precursores hematopoiéticos (GRATAMA *et al.*, 1998; FADINI *et al.*, 2008; WATT *et al.*, 2010).

O CD133 ou prominina-1 é uma glicoproteína transmembrana que tem a função ainda desconhecida, contudo tem sido mostrado que células CD133+ possuem a habilidade de se diferenciar em diferentes tipos celulares, de acordo com o microambiente em que estão inseridas. Na presença de VEGF são capazes de se diferenciar em células endoteliais (RIBATTI, 2007; FADINI *et al.*, 2008; WATT *et al.*, 2010).

O KDR ou VEGFR2 é uma proteína que age como receptor para o VEGF e está envolvido na proliferação, brotamento, migração e formação de túbulos de células endoteliais. Ele é

expresso em diversos tipos celulares que incluem células endoteliais, mesenquimais e megacariócitos (FADINI *et al.*, 2008).

O CD146, ou MCAM é uma glicoproteína de membrana da superfamília das imunoglobulinas que age como molécula de adesão cálcio dependente, é expressa em células mesenquimais, angioblastos, células endoteliais, linfócitos T e é utilizado como um marcador de progressão de metástase de melanoma, além de participar do processo de angiogênese (GUEZGUEZ *et al.*, 2007; TRIPODO *et al.*, 2009).

CD31 ou PECAM é uma proteína da superfamília das imunoglobulinas que é expressa na superfície das plaquetas, monócitos, neutrófilos, linfócitos T e células endoteliais. Está localizada nas junções intercelulares e tem a função de mediar a adesão célula-célula e participa de eventos biológicos como trombose, hemostasia e resposta inflamatória (SENEGAGLIA, 2007; WATT *et al.*, 2010).

O fvW é uma glicoproteína multimérica presente no plasma sanguíneo, e expressa constitutivamente em células endoteliais, megacariócitos e células subendoteliais. Em condições fisiológicas, essa proteína é armazenada nas células endoteliais em estruturas denominadas corpúsculos de Weibel-Palade. Ele tem a função de mediar a adesão plaquetária a locais de lesão vascular; tem função na formação de trombos; protege o fator VIII da degradação plasmática, impedindo sua inativação pela proteína C. Uma anormalidade quantitativa ou qualitativa do fvW leva ao desenvolvimento da doença de von Willebrand (JOÃO, 2001; SENEGAGLIA, 2007; MEYER *et al.*, 2009).

VE-caderina ou CD144 é uma proteína da superfamília das caderinas localizada nas junções interendoteliais e participa das interações celulares homotípicas. A VE-caderina parece ter um papel importante morfogênese vascular, além de controlar a permeabilidade vascular (GORY-FAURÉ *et al.*, 1999).

CD14 e CD45 são marcadores de células hematopoiéticas e tem uma expressão diferenciada entre as diferentes subpopulações das CPes. CD14 é uma proteína que pode ser encontrada na forma solúvel ou ancorada a fosfolipídio de membrana é expressa em monócitos e tem baixa expressão em neutrófilos. O CD14 age como co-receptor para TLR4 e está envolvido no reconhecimento de LPS durante infecções bacterianas (SIMMONS *et al.*, 1989; SENEGAGLIA, 2007; WATT *et al.*, 2010). CD45 é uma fosfatase tirosina que possui elevada expressão entre os leucócitos, sendo utilizada como um pan marcador de leucócitos. Ela pode

ser diferenciada em dois subgrupos CD45RA (marcador de linfócitos T *naïves*) e CD45RO (marcador de linfócitos T de memória) (SENEGAGLIA, 2007; WATT *et al.*, 2010).

Após migrarem para o sangue periférico as CPEs perdem a expressão de c-Kit e diminuem a expressão de CD133 (HRISTOV *et al.*, 2003). As CPEs circulantes são as células mais estudadas na atualidade por serem utilizadas como marcadores de doenças cardiovasculares. A quantificação dessas células é feita através da técnica de citometria de fluxo, utilizando diversos marcadores. Na literatura tem sido utilizado classicamente 2 estratégias de marcações para a quantificação das CPEs circulantes. Na primeira estratégia são utilizados os marcadores CD34, CD133 e KDR e na segunda CD34, KDR e CD45. Devido a pequena quantidade de CPEs circulantes é necessário um número elevado de aquisições no citômetro entre 500.000-1000000, para que seja possível uma quantificação real dessas células (FADINI *et al.*, 2008). A partir dessas marcações, diferentes populações celulares podem ser identificadas as quais possuem relevância para as doenças cardiovasculares, são elas as células CD34⁺/CD133⁺ e células CD34⁺/KDR⁺ (RIBATTI, 2007; YODER *et al.*, 2007; FADINI *et al.*, 2008; WATT *et al.*, 2010). As células CD34⁺/CD133⁺ representariam os progenitores circulantes, são células imaturas e podem incluir progenitores hematopoiéticos ou endoteliais. As células CD34⁺/KDR⁺ podem representar progenitores imaturos comprometidos com a linhagem endotelial. Esta população celular corresponde ao tipo celular inicialmente descrito por Asahara, as CFU-EC, ou células endoteliais circulantes, contudo, poucas evidências suportam essa hipótese (BLANN *et al.*, 2005; TURA *et al.*, 2007; FADINI *et al.*, 2008). CASE e Col. (2007) observaram que as células CD34⁺/KDR⁺/CD133⁺ não formaram CPEs, mas progenitores hematopoiéticos que expressaram CD45. De forma semelhante TIMMERMANS e Col. (2007) investigaram a possível relação entre as EOCs e a expressão fenotípica de CD34 e CD133 e constaram que as EOCs não são originadas de precursores CD45⁺ ou CD133⁺. Diante disso, para excluir a população hematopoiética das marcações de CPEs a segunda estratégia foi desenvolvida. Nesta estratégia é possível avaliar adicionalmente as células CD34⁺/CD45⁺ que representariam os progenitores hematopoiéticos e as células CD34⁺/CD45^{low/-} descritos como progenitores não hematopoiéticos e células CD34⁺/KDR⁺/CD45^{low/-}, fenótipo das CPEs mais aceito na literatura (FADINI *et al.*, 2007).

Após serem mobilizadas para o sangue periférico as CPEs se dirigem para os sítios ativos de neoangiogênese. Durante esse processo elas perdem a expressão de CD133 e CD34. Embora o CD34 esteja expresso no endotélio ativado, faltam evidências na literatura que comprovem a expressão de CD34 em células endoteliais em cultura (HRISTOV *et al.*, 2003; FADINI *et al.*,

2007). O isolamento das CPEs tem sido realizado por diferentes protocolos o que dificulta a comparação entre as diferentes células isoladas. As células em cultivos podem ser caracterizadas fenotipicamente de acordo com um painel de marcadores endoteliais como: CD31, CD144, KDR e ligação a lectina Ulex (FADINI *et al.*, 2007). A Ulex lectina é uma lectina ligada a fucose e participa da regulação na adesão celular e possui importantes funções no sistema imune. Para excluir as populações hematopoiéticas e mesenquimais das culturas outros marcadores podem ser utilizados como CD45 e CD14 e CD105, CD29 e CD90 respectivamente. Embora os dois últimos não sejam específicos de células mesenquimais. O CD105 ou endogлина é uma glicoproteína transmembrana e receptor do TGF- β expresso em células mesenquimais, endoteliais, células musculares lisas, precursores eritróides e de células B, monócitos ativados, macrófagos, células dendríticas foliculares e melanócitos. Ela tem função no desenvolvimento cardiovascular e remodelamento vascular (BARBARA *et al.*, 1998; SENEGAGLIA, 2007; WATT *et al.*, 2010). O CD29 ou β 1-integrina é proteína amplamente expressa nas células mesenquimais, neuronais, endoteliais e células hematopoiéticas. Ela está envolvida na adesão celular, reparo tecidual e resposta imune (PRUSZAK *et al.*, 2009). CD90 ou Thy-1 é uma proteína de superfície celular ancorado em um glicofosfatidilinositol (GPI). Essa proteína é expressa em diversos tipos celulares como em células-tronco mesenquimais e hematopoiéticas, células NK, células T, células endoteliais, fibroblastos, miofibroblastos e células dendríticas foliculares. A função do CD90 ainda não está completamente elucidada, contudo parece participar como regulador de interações célula-célula, célula-matriz, regeneração axonal, apoptose, adesão e migração celular, metástase tumoral, inflamação e fibrose (HEGE & HAGOOD, 2006).

Papel das CPEs no Processo de Neoangiogênese

Após serem mobilizadas no sangue periférico as CPEs se dirigem de acordo com o gradiente de fatores inflamatórios e pró-nangiogênicos, para os sítios ativos de neoangiogênese. Nestes locais estas células podem potencialmente participar da formação de novos vasos, estimulando as células residentes a proliferarem, promovendo a angiogênese ou se diferenciando em células endoteliais e integrando os vasos nascentes, promovendo a vasculogênese (URBICH & DIMMELER, 2004; PRATER *et al.*, 2007; CHAO & HIRSCHI, 2010; CRISTER & YODER, 2010). Esta capacidade está diretamente relacionada ao tipo celular utilizado. As CPEs de origem hematopoiética parecem estimular a angiogênese por

secretar fatores proangiogênicos como VEGF, enquanto as CPEs de origem endotelial (“late” CPEs ou outgrowth endothelial cell - OECs) estimulariam a vasculogênese (CRISTER & YODER, 2010).

A angiogênese ocorre em etapas que envolvem: a degradação da matriz extracelular; migração das células endoteliais para os sítios ativos de angiogênese; proliferação celular e estabilização dos vasos neoformados (URBICH & DIMMELER, 2004; FRANCIS *et al.*, 2008). Em condições fisiológicas a maioria dos vasos sanguíneos são quiescentes e a angiogênese ocorre apenas no ciclo ovariano e na placenta durante a gestação (CARMELIET, 2005). Sob estas condições as células endoteliais têm importantes interações com a matriz extracelular (MEC) e a membrana basal. No estágio inicial da angiogênese ocorre o aumento da expressão local de proteases que degradam a membrana basal, permitindo a migração das células e o brotamento vascular. Após a migração para os locais angiogênese ativa, as células proliferam formando redes vasculares instáveis. A rede vascular neoformada é remodelada dentro de um sistema estável com arquitetura que permite sanar as necessidades metabólicas específicas do tecido (FRANCIS *et al.*, 2008; SILVA *et al.*, 2008). Estudos da literatura sugerem que tipos especializados de células endoteliais, com distintas especificações celulares são requeridos para a formação dos novos vasos. As “Tip cells” ou células do topo dos vasos nascentes tem a função de migrar em direção ao estímulo angiogênico e proliferam minimamente. As “Stalk cells” são células responsáveis pela elongação dos vasos, elas proliferam, formam junções e lúmen celular. As “Phalanx cells”, são a maioria das células endoteliais quiescentes que revestem os vasos neoformados e são cobertas pelos pericitos. Estas células tem a função de otimizar o fluxo sanguíneo, perfusão tecidual e oxigenação (SMET *et al.*, 2009). Esta complexa formação dos novos vasos é guiada por importantes estímulos neuronais, que levarão a correta organização da rede vascular nascente. A grande similaridade da morfogênese das redes vascular e neuronal tem suscitado questões intrigantes a cerca da organização genética e morfogênica de ambas, levando a descoberta de relações cada vez mais estreitas entre esses sistemas (CARMELIET, 2003; AUTIERO *et al.*, 2005; WILSON *et al.*, 2006).

O processo de vasculogênese envolve a formação de novos vasos a partir de células precursoras. O mecanismo desse processo envolve uma seqüência coordenada de eventos que envolvem mobilização, quimiotaxia, adesão, transmigração e diferenciação celular. Após a liberação de estímulos pró-angiogênicos como VEGF, SDF-1, EPO, estatina, estrogênio, exercício as CPEs são mobilizadas da medula óssea em direção ao sangue periférico.

Seguindo um gradiente de citocinas, principalmente SDF-1 e VEGF, essas células se dirigem para os locais de neoangiogênese ativa, iniciando o “homing” celular (URBICH & DIMMELER, 2004). O “homing” das CPEs envolve a adesão dos progenitores à células endoteliais ativadas pelas citocinas e isquemia e a transmigração dessas células através da monocamada endotelial, sobretudo com participação do CD31 (PECAM). Após a transmigração as CPEs migram em direção aos estímulos angiogênicos como SDF-1 e VEGF, se diferenciam em células endoteliais e integram os vasos neoformados. O VEGF tem um papel essencial neste processo de diferenciação celular (URBICH & DIMMELER, 2004; SCHMIDT *et al.*, 2007). Além do VEGF outros fatores também são de essencial importância para o controle da formação de novos vasos como FGF, HGF e MCP-1 (MURAKAMI & SIMONS, 2008).

CPEs nas Doenças

Após a descoberta de Asahara e colaboradores, numerosos trabalhos tem demonstrado o papel das CPEs em diversas condições patológicas. Uma disfunção dessas células pode estar associada com o desenvolvimento de diversas doenças como o câncer, doenças cardiovasculares e inflamatórias (CALZI *et al.*, 2010).

Câncer: Em pacientes com câncer de pulmão, hepatocelular, coloretal, de mama, linfomas e mieloma tem sido identificada uma elevada frequência de CPEs circulantes (DOME *et al.*, 2006; DOME *et al.*, 2008). Segundo a literatura a liberação de VEGF, FGF, SDF-1 e GM-CSF derivados do tumor decorrente da hipóxia e isquemia vascular ativam o compartimento da medula óssea, levando a mobilização e recrutamento de células derivadas da medula óssea para o tumor. O recrutamento de células pró-angiogênicas contribui significativamente para a neoangiogênese e crescimento tumoral. Entre as células que são recrutadas estão células hematopoiéticas, progenitores perivasculares e CPEs (AHN & BROWN, 2009; CALZI *et al.*, 2010; JANIC & ARBAB, 2010; PATENAUDE *et al.*, 2010).

Doenças Cardiovasculares: Após 10 anos de estudos as CPEs têm sido estudadas como um novo biomarcador para avaliar a gravidade clínica de doenças cardiovasculares e como uma potencial fonte celular para a medicina regenerativa. Estudos têm avaliado o papel das CPEs em doenças como infarto, hipertensão, dislipidemia e diabetes (MÖBIUS-WINKLER *et al.*, 2009). Em geral nas doenças cardiovasculares o número de CPEs circulantes têm sido

encontrado diminuídos (UMEMURA & HIGASHI, 2008; CHANG *et al.*, 2009). CHANG e Col. (2009) encontraram níveis diminuídos e uma capacidade migratória prejudicada de CPEs CD31+/CD34+ e CPEs CD34+/KDR+ em pacientes com infarto agudo do miocárdio. Estes valores correlacionaram-se positivamente com os níveis séricos de SDF-1 α , demonstrando que o número de CPEs circulantes é correlacionado inversamente com o fator de risco para doença arterial coronariana. Esses resultados estão concordantes com dados encontrados na literatura para doenças cardiovasculares como hipertensão, dislipidemia e diabetes melitus (CHEN *et al.*, 2004; GALLAGHER *et al.*, 2007; INGRAM *et al.*, 2008; JUNHUI *et al.*, 2008; UMEMURA & HIGASHI, 2008; CHANG *et al.*, 2009; RODRIGUEZ *et al.*, 2009; MAGEN *et al.*, 2010). O mecanismo dessa redução do número de CPEs circulantes ainda não está completamente elucidado, mas acredita-se que a redução da bioatividade do NO pode levar a redução da mobilização dessas células da medula óssea. Em pacientes com dislipidemia essa redução está associada com os níveis elevados de LDL oxidado, que parece aumentar a senescência celular, e prejudicar a capacidade adesiva, migratória e de formação de túbulos das CPEs (CHEN *et al.*, 2004; UMEMURA & HIGASHI, 2008; RODRIGUEZ *et al.*, 2009). Em camundongos com diabetes a redução do número de CPEs além de estar associada com a redução da bioatividade do NO, devido a uma fosforilação prejudicada da eNOS da medula óssea, a redução da expressão de SDF-1 α no local da lesão parece comprometer a mobilização das células para os sítios ativos de neoangiogênese (GALLAGHER *et al.*, 2007). Estudos com infarto agudo do miocárdio revelam que logo após o infarto os níveis de CPEs estariam elevados, sendo reduzido em seguida, logo o período de determinação dos níveis dessas células é essencialmente importante (TOUSOULIS *et al.*, 2009). Alguns autores sugerem que as células promoveriam o reparo tecidual através do mecanismo de transdiferenciação em cardiomiócitos, contudo essa hipótese está sob investigação. O efeito parácrino através da secreção de fatores angiogênicos como VEGF, SDF-1 α , IGF, resultando em uma melhora da vascularização do tecido lesado, tem sido um mecanismo terapêutico plausivamente proposto (MÖBIUS-WINKLER *et al.*, 2009).

Doenças Inflamatórias: Além das doenças vasculares citadas acima, outras patologias também tem sido estudadas no contexto das CPEs. As doenças inflamatórias como Lúpus Eritematoso Sistêmico (LES), Artrite Reumatóide (AR) e Doença Falciforme também podem ser citadas. Em pacientes com LES e AR os níveis periféricos de CPEs estão reduzidos e a funcionalidade da célula parece estar comprometida (WESTERWEEL *et al.*, 2007; DISTLER *et al.*, 2009, EBNER *et al.*, 2010). Os níveis diminuídos CPEs em pacientes com LES têm

apresentado uma correlação inversa com os níveis de INF- α e a função prejudicada das células. Contudo os níveis de CPEs em pacientes com LES e RA tem sido encontrado semelhante aos dos pacientes controles, de modo que os níveis periféricos dessas células estão estritamente relacionados com a atividade da doença (EGAN *et al.*, 2008; GRISAR *et al.*, 2008; DISTLER *et al.*, 2009; VILLEROCHÉ *et al.*, 2010). Citocinas inflamatórias como TNF têm sido relacionadas com os níveis de CPEs em pacientes com doenças reumatóides e correlacionadas com a perda da funcionalidade celular por induzir a apoptose das células circulantes (DISTLER *et al.*, 2009; PÁKOZDI *et al.*, 2009).

Em pacientes com a doença falciforme a primeira descrição dos níveis de CPEs foi feita em 2009 por BEEM e colaboradores. Neste trabalho os autores evidenciaram níveis elevados de precursores endoteliais em pacientes falciformes durante as crises dolorosas, não sendo detectados níveis dessas células em pacientes assintomáticos e controle. Os níveis de IL-8 e VEGF também foram analisados. Os pacientes em crise apresentaram níveis mais elevados de IL-8 e os níveis de VEGF foram quatro vezes maiores neste pacientes com relação aos pacientes assintomáticos. Contudo diante da diversidade fenotípica e genotípica da doença faz-se necessário um estudo utilizando um grupo mais homogêneo possível para inferências mais conclusivas. A anemia falciforme é uma das formas genotípicas mais graves das doenças falciformes, logo um estudo sobre a importância das CPEs nessa população seria de fundamental importância. Além disso, embora a promissora utilização da terapia celular no tratamento da osteonecrose de pacientes falciformes tenha albergado resultados animadores, o mecanismo dessa terapia permanece desconhecido. Logo, haja vista a potencial importância das CPEs no processo de neovascularização, um estudo mais detalhado do perfil fenotípico dessas células e sua capacidade funcional são necessários para se determinar o papel dessas células na terapia celular de pacientes falciformes.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

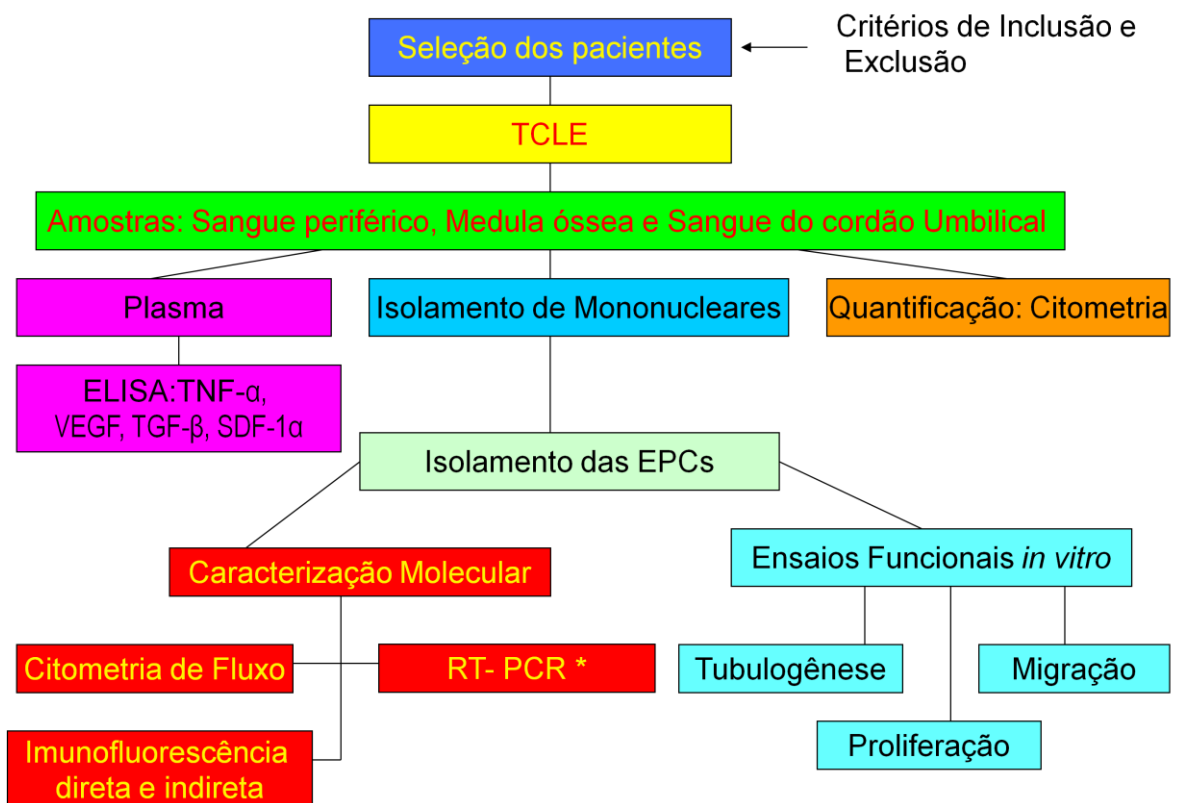
Avaliar os aspectos imunobiológicos das células progenitoras endoteliais de indivíduos com anemia falciforme

2.2 Objetivos específicos

- Quantificar as CPEs no sangue periférico e medula óssea dos pacientes com anemia falciforme;
- Isolar e caracterizar os aspectos biológicos das CPEs dos pacientes falciformes
- Analisar os níveis da citocinas inflamatória (TNF), e pró-angiogênicas (TGF- β , VEGF e SDF-1 α) no plasma dos pacientes falciformes.

3 METODOLOGIA

3.1 Fluxograma de atividades.



3.2 Casuística

Crítérios de Inclusão: Pacientes adultos com anemia falciforme em estado estável. **Crítérios de Exclusão para amostras de sangue periférico:** pacientes com idade inferior a 18 ou superior a 65 anos, traços de talassemias, deficiência de G6PDesidrogenase, transfusão sanguínea há 6 meses, tratamento com hidroxiuréia, uso de suplementos vitamínicos outros

que não ácido fólico, gestação, doenças não relacionadas à anemia falciforme. **Critérios de Exclusão para amostras de medula óssea:** pacientes com idade inferior a 18 ou superior a 65 anos, em crise dolorosa vaso-oclusiva. **Dificuldades encontradas:** Devido a raridade da amostra de medula óssea um número reduzido de pacientes foram incluídos no estudo o que dificultou a análise final dos resultados.

3.3 Coleta e processamento de células mononucleares da medula óssea e do sangue periférico.

Os pacientes falciformes atendidos no ambulatório de ortopedia e traumatologia do COM-HUPES-UFBA foram selecionados para participação da pesquisa clínica intervencionista coordenada pelo médico ortopedista e pesquisador Dr. Gildásio de Cerqueira Daltro de acordo com normas estabelecidas para pesquisa clínica do país através da assinatura voluntária do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Maternidade Climério de Oliveira/ UFBA, de acordo com as exigências brasileiras para o desenvolvimento da pesquisa científica no país (Parecer/resolução aditiva nº 086/2011). Os pacientes selecionados sob anestesia geral no Centro Cirúrgico foram submetidos à punção e aspiração na crista ilíaca e colhidos 100-120 ml de medula óssea para a realização do protocolo clínico e adicionalmente foi coletado 10-20ml de medula óssea para isolamento das CPEs e células-tronco mesenquimais, e avaliação das propriedades moleculares e funcionais das células. As células mononucleares foram separadas em gradiente de ficoll (Ficoll-Paque, GE Healthcare, Uppsala, Sweden) utilizando o equipamento automatizado e certificado, SEPAX (Biosafe, Eysins, Switzerland) ou alternativamente, um sistema de separação manual em centrífuga clínica convencional (Figura 4.). Para preparo das células a serem enxertadas no paciente, a bolsa contendo 100-120ml de medula óssea foi conectada ao kit de separação de células mononucleares CS-900 (Sepax kit CS-900, Biosafe, Eysins, Switzerland) instalado adequadamente ao aparelho como descrito pelo fabricante. O equipamento foi programado, previamente, para processar um volume total de medula óssea de 100-120ml, proceder 2 lavagens da fração de mononucleares isoladas com solução salina fisiológica contendo 5% de albumina sérica humana (Baxter, Healthcare, Newbury, UK) e ressuspender as CMMOs totais no volume total de 50ml em solução salina contendo albumina humana. Após a separação, as bolsas contendo as CMMOs foram

entregues aos médicos ortopedistas que procederam a infusão no local da osteonecrose de pacientes com a doença falciforme (figura 5).



Figura 3. Equipamento Sepax (Biosafe, Eysins, Switzerland).



Figura 4. Procedimento de punção de medula óssea em pacientes com osteonecrose da cabeça do fêmur.

O material biológico obtido de pacientes atendidos no ambulatório de Hematologia do COM-HUPES-UFBA foi encaminhado para o Laboratório de Bioengenharia Tecidual ou Biomateriais e o Laboratório de Imunologia no Instituto de Ciências da Saúde da UFBA e a separação manual das células mononucleares foi realizada. Os pacientes foram informados da pesquisa e após assinarem o TCLE coletou-se 5-10 ml de sangue periférico por punção venosa. O sangue foi centrifugado a 2000rpm por 10 minutos e o plasma imediatamente congelado a -20°C . As CMMOs ou do sangue periférico foram separadas, manualmente, em gradiente de ficoll (Ficoll-Paque, GE Healthcare, Uppsala, Sweden) (Figura 6). O volume de 10-20ml de medula foi centrifugado (Eppendorff, Hamburg, Germany) a 2000rpm por 10 minutos para retirada do plasma, que foi imediatamente congelado no freezer a -20°C . Em

seguida foi adicionado à fração celular foi recomposta com CMF (Solução livre de cálcio e magnésio) com o mesmo volume retirado de plasma. Em tubos de 15ml (Eppendorff, Hamburg, Germany) foi adicionado 3ml de ficoll e em seguida 9ml da suspensão celular reconstituída. Os tubos foram centrifugados a 2500rpm por 15 minutos para separação das células mononucleares. Após a centrifugação as células mononucleares foram lavadas uma vez com CMF e centrifugadas novamente a 2000rpm por 10 minutos. Após a centrifugação as células foram ressuspensas em meio de cultura, e o número de células totais contados com auxílio da câmara de Neubauer (Laboroptik, Germany). Em seguida as células mononucleares separadas foram plaqueadas em placas de cultura de 6 poços (TPP- Thecno Plastic Products AG, Switzerland) para isolamento das CPEs com base na adesão ao plástico.



Figura 5. Separação manual das células mononucleares utilizando Ficoll-Paque.

3.4 Separação das células mononucleares de sangue de cordão umbilical

O sangue de cordão umbilical foi obtido de pacientes saudáveis atendidos no Instituto de Perinatologia da Bahia (IPERBA). Imediatamente após o parto 30-50 ml do sangue do cordão umbilical foi coletado em tubos falcon de 50ml (TPP- Thecno Plastic Products AG, Switzerland) com anticoagulante (Heparina). O sangue foi levado para o laboratório e a fração de células mononucleares separada utilizando Hespan (Hetastarch) (6% hetastarch em 0.9% de cloreto de sódio). Inicialmente, o sangue foi diluído em CMF e em seguida, adicionado o volume de Hespan de modo que se obtivesse uma suspensão celular com 1,5% hetastarch. Em seguida os tubos foram mantidos em repouso por 30 minutos até a separação, por decantação, das células mononucleares. Após a separação as células foram coletadas com CMF e centrifugadas (Eppendorff, Hamburg, Germany) a 2000rpm por 10 minutos. Após a centrifugação as células nucleadas foram ressuspensas em meio de cultura α -MEM (Sigma

Aldrich, NY, USA) suplementada com 20% de soro fetal bovino (FCS), antibióticos e contadas com o auxílio da câmara de Neubauer (Laboroptik, Germany). As células purificadas foram então plaqueadas em placas de cultura de 6 poços (TPP- Thermo Plastic Products AG, Switzerland) para isolamento das CPEs por adesão ao plástico.

3.5 Isolamento das Células Progenitoras Endoteliais (CPEs).

As CPEs foram isoladas da fração de células mononucleares como descrito por YODER et al, (2007). Após purificação em Ficoll, a fração de células mononucleares foi plaqueada em placas de 6 poços, contendo um filme de colágeno ou fibronectina (TPP- Thermo Plastic Products AG, Switzerland) na densidade celular de 2×10^7 células/poço na presença de um meio de cultura seletivo para células endoteliais, EGM-2 (Endothelial Growth Medium – 2) (EGM-2, Lonza, Basel, Switzerland). Após 24h de cultivo o meio de cultura foi removido e substituído para retirada das células hematopoiéticas e células endoteliais não aderentes. A cada 3 dias o meio de cultura foi renovado, as culturas lavadas 3x com BSS-1X (Buffer Saline Solution) e um novo meio de cultura adicionado. Após 15-21 dias as primeiras colônias apareceram e as culturas foram mantidas até a confluência celular.

Cultivo e subcultivo das CPEs

Na confluência as células foram submetidas a dissociação enzimática utilizando tripsina 1,25mg/ml. As células foram removidas para um tubo falcon de 50ml e centrifugadas (Eppendorff, Hamburg, Germany) a 2000rpm por 10 minutos. Após a centrifugação o sobrenadante foi removido e as células ressuspensas em meio EGM-2. Em seguida as células foram contadas utilizando o corante azul de tripan. Após a contagem a células foram novamente plaqueadas mantendo sempre uma razão de subcultivo celular de 1:3, ou seja, de um poço (ou uma garrafa de 25cm²) para 3 poços (ou 3 garrafas de 25cm²). As células foram subcultivadas para serem congeladas e utilizadas nos experimentos até a quarta passagem.

3.6 Quantificação das CPEs do Sangue Periférico e Medula Ossea por Citometria de Fluxo

As CPEs foram quantificadas no sangue periférico e na medula óssea utilizando a técnica de citometria de fluxo como descrito por Fadini et al (2008). Da medula óssea/sangue periférico

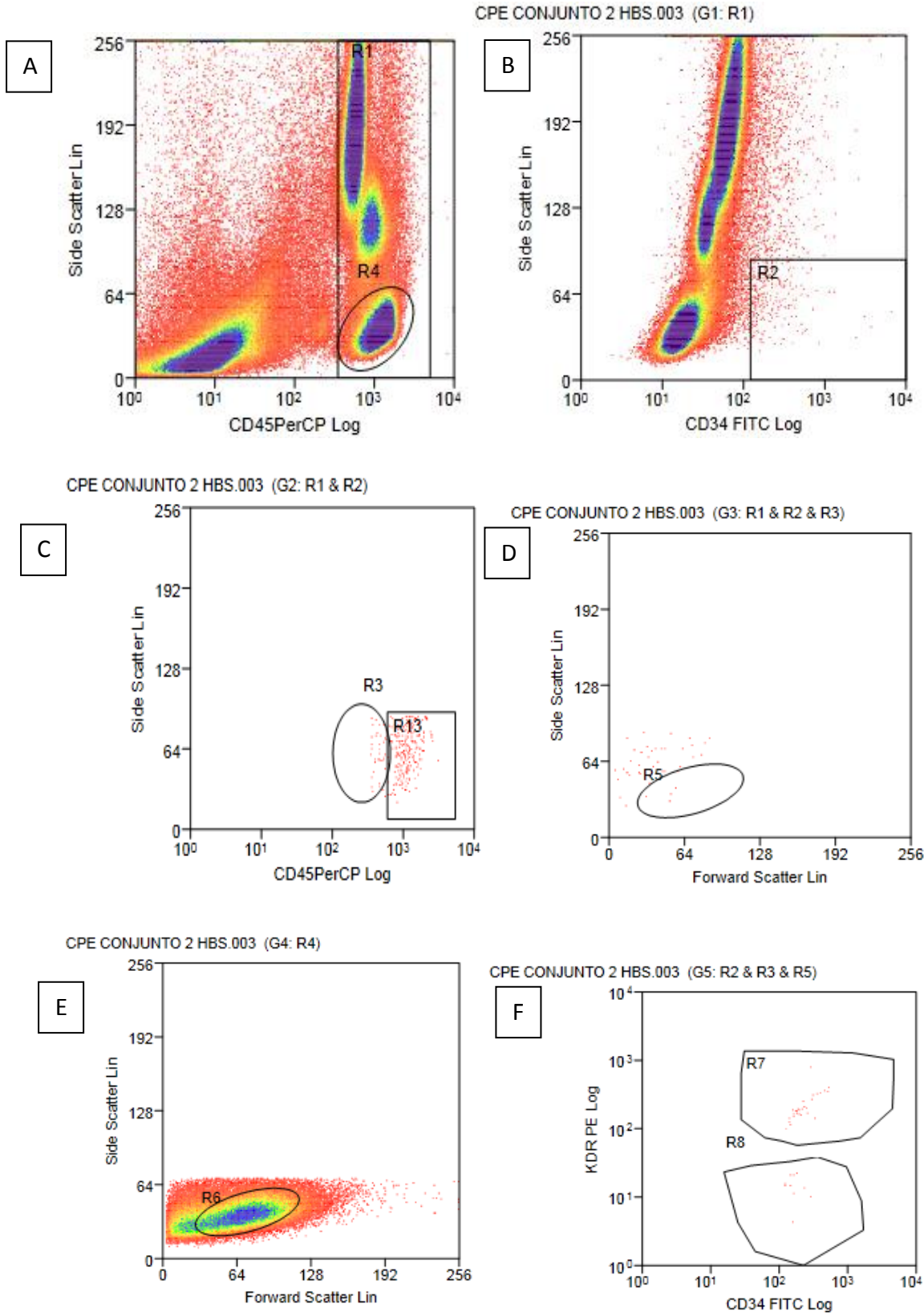
total foi adicionado 1×10^6 células/tubo para realização das marcações. Para cada paciente foram separados 3 tubos para marcações, um para autofluorescência e dois tubos para as respectivas estratégias de marcações. As marcações dos controles isotipos utilizando anticorpos anti-IgG1 ligado a PE de camundongo (eBioscience, CA, USA), anti-IgG1 ligado a PerCP de camundongo (Becton Dickinson, CA, USA) e anti-IgG1 ligado a FITC de camundongo (BD Bioscience, NJ, USA) foram feitos apenas para os experimentos iniciais. Na primeira estratégia foram utilizados 10µl dos anticorpos anti-CD34-FitC (BD Bioscience, NJ, USA), anti CD45-PerCD (pan-marcador de leucócitos) (BD Bioscience, NJ, USA), e anti-KDR-PE (R&D System, Mineapolis, USA). Na segunda estratégia foram utilizados anticorpos 10µl dos anticorpos biotinilados anti-CD34-PerCP (Becton Dickinson, CA, USA) anti-CD133 – PE (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany), ambos marcadores de células-tronco, e anti-KDR (VEGFR2) – FitC (R&D System, Mineapolis, USA) marcador de células endoteliais. Todos os anticorpos foram utilizados na concentração descrita pelo fabricante. Da medula óssea/sangue periférico foi feita a contagem dos leucócitos totais utilizando 10µl de medula óssea/sangue periférico e 90µl de líquido de Turk. Em seguida foi procedida a contagem em câmara de Neubauer (Laboroptik, Germany). Após a contagem, 1×10^6 células foram centrifugadas a 2000rpm por 10 minutos à 4°C e imunofenotipadas utilizando 10µl dos anticorpos. As células foram incubadas a temperatura ambiente e ao abrigo da luz por 30 minutos, lavadas com CMF contendo 3% soro fetal bovino (Cultilab, Campinas, Brasil) e centrifugadas. Em seguida foi adicionado 1ml do tampão de lise (BD Bioscience, NJ, USA) e os tubos incubados por 10 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, as células foram lavadas, centrifugadas, ressuspensas em 500µl da solução BSS/CMF contendo 3% soro de fetal bovino (Cultilab, Campinas, Brasil) e analisadas no citômetro de fluxo (FACScalibur, BD Bioscience, NJ, USA). Um total de até 500.000 eventos foi adquirido para cada tubo. Após a aquisição do citômetro os resultados obtidos foram expressos em percentual ou número de eventos totais encontrados no total de eventos adquiridos. Para aquisição/análise dos resultados foi utilizado uma modificação do protocolo padronizado de contagem de células CD34+ pelo International Society of Hematotherapy Graft Engineering (ISAHAGE)

Desenvolvimento da estratégia de análise das subpopulações celulares

As CPEs foram quantificadas no sangue periférico e medula dos pacientes falciformes utilizando a técnica de citometria de fluxo. O sangue de cordão umbilical foi utilizado como controle positivo para a frequência das Células Progenitoras Endotelial (CPEs), por

representar o maior nicho pós-natal dessa população celular (YODER et al, 2007). Neste experimento 1×10^6 células foram imunofenotipadas utilizando estratégias de marcações e foram adquiridos no citômetro de fluxo cerca de 500.000 eventos como descrito por FADINI et al (2008).

Na primeira estratégia as células foram marcadas com anti-CD34-FITC+anti-VEGFR2-PE+anti-CD45-PerCP e a quantificação dos eventos foi baseada e adaptada de acordo com SCHMIDT-LUCKE et al, (2010). A estratégia de marcação desse conjunto está representada na figura 8. A princípio as células foram selecionadas na região de linfócitos, monócitos e granulócitos (R1) na figura 8A, utilizando os parâmetros granulosidade celular (side scatter) e intensidade de fluorescência no canal 3 (FL3) do anticorpo anti-CD45. Em seguida em R1 foram selecionados eventos na região dos linfócitos (R2) de acordo com os parâmetros granulosidade e os eventos positivos no canal FL1 para CD34, como observado na figura 8B. No dot plot seguinte, representado pela figura 8C, em R1 e R2 foram selecionados os eventos na região dos linfócitos (R3) de acordo com os parâmetros granulosidade e baixa expressão de CD45 em FL3, identificando a população de células $CD34^+/CD45^{-low}$ e população $CD34^+/CD45^+$ em R13. Nas figuras 8D e 8E os dot plots foram feitos para a confirmação da origem na linfogate (R4, na Figura 8A) da população purificada em R3 (Figura 8C). Finalmente, dentro da região R3, foram selecionados eventos positivos para KDR^+ e $CD34^+$, identificando a população $CD34^+/KDR^+/CD45^{-low}$ (R7), observado na figura 8F. A população $CD34^+/KDR^+$, foi identificada selecionando-se eventos positivos na região dos linfócitos em R9 e R10 utilizando os parâmetros granulosidade e intensidade de fluorescência no canal 2 (FL2) de anticorpo anti-KDR e anti-CD34, respectivamente, como descrito na figura 8G e figura 8H. Em seguida em R9 e R10 foram selecionados eventos positivos na linfogate (R11) de acordo com os parâmetros granulosidade e complexidade (forward scatter), representativos da população $CD34^+/KDR^+$ (figura 8I).



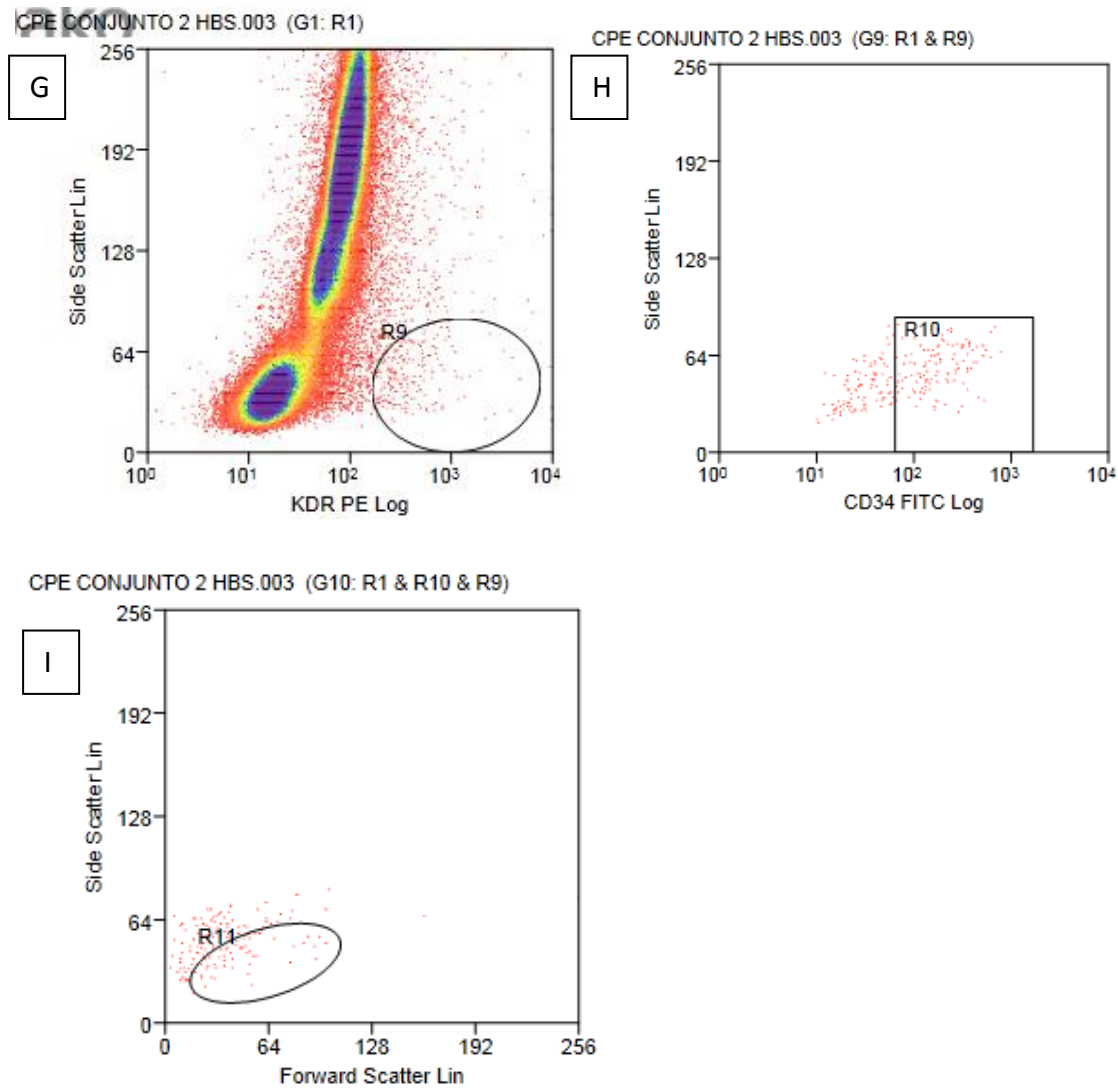


Figura 6. Estratégia de análise das subpopulações de células $CD34^+/CD45^+$ (C) e $CD34^+/KDR^+/CD45^{low/-}$ (F). Na figura A foram selecionados eventos positivos para CD45 (R1). Dentro de R1 em B a população $CD34^+$ foi selecionada (R2). Dentro de R1 e R2 em C foram selecionados eventos com baixa expressão (R3) e alta expressão de CD45 (R13) (população $CD34^+/CD45^+$). Em F, foi realizada a da interseção das populações em R2, R3 e R5 e obtido uma população em R7, positivos para CD34 e KDR, representando a fração celular $CD34^+/KDR^+/CD45^{low/-}$.

A primeira estratégia utilizou-se anticorpos anti-CD34- acoplado a PerCP, anti-CD133- acoplado a PE e anti-VEGFR2- acoplado a FITC e a quantificação dos eventos foi baseada e adaptada de acordo com SCHMIDT-LUCKE et al, (2010) . Inicialmente as células foram selecionadas na região dos linfócitos, monócitos e granulócitos (R1), utilizando os parâmetros granulosidade das células por intensidade de fluorescência no canal 3 (FL3) do anticorpo anti-CD34. Em seguida na região R1 foram selecionados eventos na região dos linfócitos (R2) de acordo com os parâmetros granulosidade e os eventos positivos no canal FL2 para CD133, identificando a população $CD34^+/CD133^+$. Finalmente, dentro da região R3, foram

selecionados eventos positivos para KDR e CD34, identificando a população CD34⁺/CD133⁺/KDR⁺ (R7). A população CD34⁺/KDR⁺ foi identificada como descrito no segundo conjunto.

A partir do número de eventos encontrados foi calculado o número de células positivas em um milhão de eventos adquiridos em seguida esse valor foi ajustado de acordo com a leucometria do paciente e o resultado final expressado em número de células/mL de sangue de acordo com os trabalhos similares publicados na literatura.

3.7 Imunocitoquímica e Observação em Microscópio de Fluorescência

Realizou-se a imunocitoquímica das CPEs cultivadas para a identificação dos seguintes marcadores: ligação da lectina biotilado *Ulex Europeus* Agglutinin – 1 (UEA-1) (Vector, USA) através de imunofluorescência direta, fator de von Willebrand (Sigma-Aldrich, NY, USA), CD31 (R&D System, Mineapolis, USA) e CD144 (VE-caderina) (R&D System, Mineapolis, USA) (YODER *et al*, 2007). As CPEs também foram analisadas pela expressão de vimentina (Vector, USA) (proteína do citoesqueleto) e alfa actina de músculo liso (Vector, USA) (marcador de células fibroblásticas). Como controles negativos das marcações foram utilizados anticorpos anti-IgG (H+L) de camundongo (Vector, USA) e anti-IgG (H+L) de coelho (Sigma Aldrich, NY, USA). Para avaliar a expressão de vimentina e alfa actina de músculo liso (AML). Após tripsinização das células foram plaqueadas na densidade celular de 1×10^5 /poço em placa de 6 poços contendo lamínulas e mantidas em cultura até alcançarem cerca de 70-80% de confluência celular. As células foram lavadas com CMF/BSS e fixadas por 30 minutos com solução de paraformaldeído 4%. As células foram lavadas com 3x com BSS e mantidas à temperatura de 4°C até a marcação com os anticorpos. Após as lamínulas serem lavadas 3x com BSS foi adicionado 1ml de solução de permeabilização BSS-1x + triton X-100 0,1% + 3% de soro fetal bovino e as células incubadas a temperatura ambiente por 30 minutos. As células foram então, lavadas 3x com BSS, adicionados os anticorpos primários e incubados à 4°C “overnight”, utilizando as seguintes diluições dos anticorpos: anti Fator de von Willebrand, diluição 1:200; CD31, 1:50; CD144 (VE-caderina), 1:10; Vimentina, 1:300; alfa actina de músculo liso, 1:50; *Ulex europaeus* Agglutinin-I (UEA-I), 1:200. Após a incubação as lamínulas foram lavadas 3x com solução de BSS 1x contendo 3% de soro fetal bovino. Os anticorpos secundários foram adicionados e incubados a 37°C por 1h, utilizando as seguintes diluições: anti-IgG (H+L) de camundongo, diluição 1:300 e anti-IgG (H+L) de

coelho, diluição 1:300. Todos os anticorpos primários e secundários foram diluídos em solução de BSS-1x + triton X-100 0,1% + 3% de soro fetal bovino, com exceção da UEA-1 e foi diluída em solução de BSS-1x. Finalmente, as células foram lavadas 2x com solução de BSS-1x contendo 3% de soro fetal bovino e preparadas para visualização ao microscópio de fluorescência. Sobre as lâminas foram adicionados 10µl do meio de montagem (antifade) (Vector, USA), 1µl de solução de DAPI 1mg/ml e por fim as células. Em seguida foi procedido a visualização ao microscópio de fluorescência. Os controles negativos foram produzidos seguindo o mesmo protocolo acima descrito, sem a adição dos anticorpos primários que foram substituídos pela solução diluente (BSS-1x + triton X-100 0,1% + 3% de soro fetal bovino).

A marcação de UEA-1 foi realizada seguindo o princípio da imunofluorescência direta. As células plaqueadas em lamínulas em poços de placas de 6 poços após alcançarem a confluência celular ideal (70-80% de confluência) foram lavadas 3x com solução de BSS-1x, marcadas com o anticorpo anti-UEA-1, já conjugado com o fluoróforo, e incubados a 4°C por toda a noite. Após a incubação as células foram lavadas 3x com solução de BSS-1x e adicionados sobre a lâmina contendo o meio de montagem e o DAPI.

O mesmo procedimento foi realizado para a observação da imunocitoquímica utilizando a microscopia confocal. Para tanto foram realizados 4 grupos de marcações, sendo um controle, que foram: CD144 + fator de von Willebrand + iodeto de propídio (PI) (1µg/ml), CD31 + Vimentina + PI, alfa actina de músculo liso + PI e o controle negativo (anti-camundongo + anti-coelho) + PI.

3.8 Citometria de Fluxo para as CPEs Cultivadas

Realizou-se a citometria das CPEs cultivadas para a identificação dos seguintes marcadores: anti-CD14 ligado a PE (monócitos) (eBioscience, CA, USA), anti-CD31 ligado a FITC (células endoteliais) (BD Pharmingen, NJ, USA), anti KDR ligado a FITC (R&D System, Mineapolis, USA) (progenitores angiogênicos), anti-CD105 ligado a PE (eBioscience, CA, USA) (endoglina, marcador de mesoangioblastos), anti-CD90 ligado a FITC (eBioscience, CA, USA) (marcador de células-tronco) e anti-CD29 ligado a FITC (eBioscience, CA, USA) (Integrina) (DAN *et al*, 2007). Após subcultivo com tripsina (Gibco, NY, USA) as células foram decantadas e contadas em câmara de Neubauer (Laboroptik, Germany).

Aproximadamente 3×10^5 células foram reservadas para a marcação com anticorpos. Após centrifugação por 10 minutos a 2000rpm, adicionou-se 10µl de cada anticorpo ou 10µl de BSS (tubo da autofluorescência) e os tubos foram incubados por 30 minutos ao abrigo da luz à temperatura ambiente. Os controles isotipos foram feitos apenas nos experimentos iniciais utilizando anticorpos anti-IgG1 ligado a FITC de camundongo (BD Bioscience, NJ, USA) e anticorpos anti-IgG1 ligado a PE de camundongo (eBioscience, CA, USA). Em seguida as células foram centrifugadas por 10 minutos a 2000rpm à 4°C. O sobrenadante foi removido e as células lisadas e fixadas por 10 minutos, a temperatura ambiente, com 1ml de tampão de lise (BD Bioscience, NJ, USA). Finalmente as células foram novamente centrifugadas, lavadas com 1ml de solução de BSS contendo 3% soro fetal bovino e ressuspensas em 500µl da solução de lavagem. As células foram imediatamente analisadas no citômetro de fluxo (FACScalibur, BD Bioscience, NJ, USA). Um total de até 50.000 eventos foi adquirido para cada tubo e os resultados gerados analisados através do programa CellQuest utilizando gráficos de histograma.

3.9 Avaliação da expressão dos genes nas CPEs por PCR.

Extração do RNA: A extração do RNA foi realizada com o auxílio de minicolunas (RNeasy Mini Kit, Qiagen, Düsseldorf, Germany). Para iniciar a extração do RNA, a monocamada de células foi lavada com BSS1x para retirada do meio de cultura. Logo após foi adicionado o tampão de extração (Lysis Buffer RLT, Qiagen, Düsseldorf, Germany) contendo o agente redutor beta-mercaptoetanol para eliminar a ação das RNases liberadas durante o processo de lise. O extrato celular removido foi transferido para um criotubo estéril e congelado a -70°C, até o momento de uso.

A concentração e a pureza do RNA obtido foi avaliada através da espectrofotometria a 260nm em nanodrop (espectrofotômetro de nanovolume). O grau de pureza da preparação foi estimado pela relação Abs_{260nm}/Abs_{280nm} , considerando-se como pureza satisfatória uma relação próxima de 2,0. As amostras que apresentaram uma reduzida concentração de RNA foram normalizadas pela redução de seu volume por centrifugação à vácuo.

Síntese do cDNA: A partir do RNA foram sintetizados cDNAs foram utilizados posteriormente para avaliação dos transcritos em cada amostra. Para a síntese do cDNA foi utilizada a enzima ImProm II Reverse Transcriptase (Promega, Madison, USA). Uma alíquota

de 1-2µg de RNA total foi tratado com a enzima DNase I e incubado no termociclador a 37°C por 10 minutos e a 75°C por 5 minutos. Em seguida foram adicionados um mix dos oligonucleotídeos trifosfatados, Adenina (ATP), Citosina (CTP), Timina (dTTP) e Guanina (GTP) (dNTP), o oligo dT, RANDON primer e água e incubados no termociclador à 65°C por 10 minutos e imediatamente depois colocado no gelo. Na etapa seguinte foi adicionado um mix da enzima ImProm II e incubado a 25°C por 10 minutos, 42°C por 2h e 75°C por 15 minutos, para a realização da síntese da fita complementar. Na etapa final foi adicionado 1µl de RNase H por tubo e incubado a 37°C por 30 minutos e 75°C por 10 minutos. Em seguida as amostras foram diluídas de 1:3 adicionando 40µl de água ultrapura. As amostras foram então congeladas a -80°C e a concentração de 1:3 foi utilizada como concentração mãe para os experimentos.

A avaliação da eficiência de cada primer no pool dos cDNAs das amostras em diferentes concentrações e 400nM dos primers. As diluições dos cDNAs utilizadas para formar a curva de eficiência dos primers foram 1:30, 1:60, 1:120 e 1:240. Após realizado a curva de eficiência os resultados foram analisados pelo Excel através uma curva de dispersão. A linha de tendência foi obtida na equação da reta que forneceu o valor R para cada curva. Os valores de R foram utilizados para avaliar a eficiência dos primers, e aqueles que obtiveram eficiência entre 1,7 e 2,0 foram considerados eficientes e utilizados nas reações subseqüentes. Primers que formaram picos secundários, observados pela curva de dissociação ou apresentaram Tm muito elevado foram descartados das análises.

As reações de PCR foram realizadas em triplicata, usando 3 µl do cDNA de cada amostra individualmente diluído de 1:30, adicionando-se 3µl dos primers avaliados individualmente na concentração determinada e 6µl do Syber® Green Dye (Applied Biosystems, USA). As reações foram realizadas em placas de 96 poços. Após a adição do cDNA, do primer, e do Syber as placas foram colocadas no Termociclador (7300 SDS, Applied Biosystems), seguindo o programa padrão de 95°C por 10 minutos (ativação da Taq Polimerase), 40 ciclos de 95°C por 15 segundos (desnaturação) e 60°C por 1 minuto (anelamento e extensão). A detecção da amplificação dos transcritos foi obtida pelo programa “7300 System SDS Software, Applied Biosystems.

Os resultados finais de expressão gênica foram avaliados seguindo cálculo de expressão relativa pelo método de Pfaffl, que considera a variação dos Cts (Cycle Threshold) de cada amostra e a eficiência dos primers (diferente de 100%). A expressão do transcrito na amostra

analisada foi avaliada em relação a uma amostra referência (controle ou não tratada). A diferença entre os valores do Cts da amostra controle e a amostra tratada, gerou o coeficiente ΔC_t . O mesmo cálculo da variação dos Cts foi aplicado para os transcritos endógenos (ou constitutivos) nas mesmas amostras, que foram posteriormente utilizados como normalizadores para cada gene. A normalização foi feita utilizando 3 genes endógenos (GAPDH, β -Actina e RN18S1).

As sequências dos primers que foram utilizadas nas reações de PCR foram obtidas no banco de dados do genoma humano (www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide). As similaridades dos oligonucleotídeos foram determinadas previamente diante através da comparação com os dados de RNAm humanos através da ferramenta BLAST (Basic Local Alignment Search Tool)/ Human genome do ncbi. A tabela 1 apresenta a relação dos primers utilizados nas reações de PCR.

Tabela 1. Sequências dos primers utilizados nas reações de qRT-PCR.

Genes		Sequências
SDF1	Fwd	CATTGACCCGAAGCTAAAGTG
	Rev	TTTCTGGGCAGCCTTTCTC
VEGFR2	Fwd	AGCCCAGAGATGCAATCG
	Rev	CTATCCTGGCTCCGTGCTC
THBS1	Fwd	CCATAACCGTCTTCACAAATCC
	Rev	AATGCGCCCTAAATCACTG
MCAM	Fwd	ACTTCCACCTCCACCAGCTC
	Rev	GTCTGCGCCTTCTTGCTC
ENG	Fwd	CTGAGGACCAGAAGCACCTC
	Rev	TCCATGTCCTCTTCCTGGAG
HIF1A	Fwd	GAAGTGGCAACTGATGAGCA
	Rev	GCGCGAACGACAAGAAA
Genes Endógenos		
GAPDH	Fwd	GAACGTCTTGCTCGAGATGTGA
	Rev	TGTTGCTGTAGCCAAATTCG
β -ACTIN	Fwd	GGCACCCAGCACAATGAAG

	Rev	CCGATCCACACGGAGTACTTG
RN18S1	Fwd	GACTTCACGCAAGCCTATGAC
	Rev	CTGTGATGCCCTTAGATGTCTG

3.10 Ensaio de Angiogênese *in vitro*

O ensaio angiogênico bidimensional em camada de matrigel (Matrigel™, BD Bioscience, NJ, USA) seguiram o protocolo sugerido pelo fabricante. Previamente foi adicionado em poços de placa de 96 poços 50µl/poço de matrigel e incubado a 37°C para polimerização do gel. Após a polimerização do matrigel as células foram cuidadosamente tripsinizadas e plaqueadas nos poços na densidade celular de 2×10^4 células/poço. O experimento foi desenvolvido sob as seguintes condições: EBM-2, EGM-2, EBM-2 + 10% de plasma normal e EBM-2 + 10% de plasma falciforme. Após serem plaqueadas as células foram incubadas por 4 horas a 37°C, 95% umidade e 5% de CO₂. Em seguida as células foram fixadas com solução de paraformaldeído 4%, coradas com solução de violeta de genciana e observadas através do microscópio invertido.

3.11 Ensaio Migração e Invasão em Câmara de Boyden Modificada

A capacidade migratória das CPEs da medula óssea cultivadas foi avaliada através do ensaio de migração e invasão *in vitro* utilizando a câmara de Boyden modificada (Figura 7). No experimento de migração celular e invasão foram utilizadas câmaras com poros de 8µm (Millex, Millipore, USA). No experimento de migração as células foram tripsinizadas, ressuspensas em 100 µl EBM-2 e plaqueadas na densidade celular de 5×10^4 células/poço na parte superior da câmara. Na parte inferior foram adicionadas 600µl das seguintes soluções em estudo: EBM-2, EGM-2, EBM-2 + 10% de plasma. Após serem plaqueadas as células foram incubadas no ambiente de 37°C, 95% de umidade e 5% de CO₂. Em seguida as células foram lavadas 3x com solução de BSS-1x e as células da parte interna da câmara superior foram removidas com um bastão contendo algodão na ponta. As células que migraram da parte externa da câmara superior foram fixadas com solução de paraformaldeído 4% por 15

minutos. Após a fixação as células foram lavadas com solução de BSS-1x, coradas com violeta de genciana e observada e contada com o auxílio do microscópio invertido.

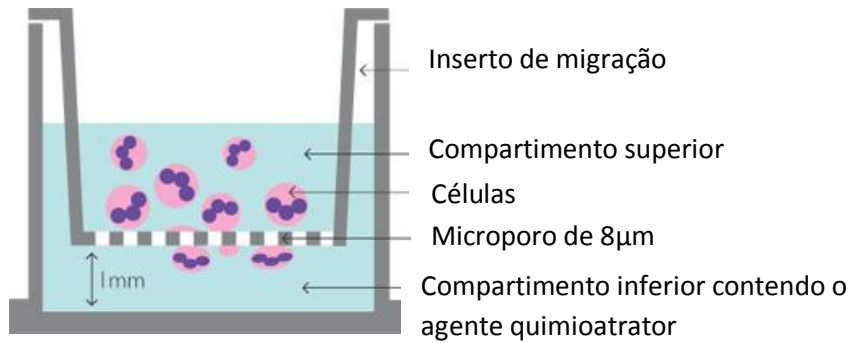


Figura 7. Modelo esquemático da câmara de Boyden utilizada nos experimentos de migração celular.

3.12 Dosagem das Citocinas no Plasma

Após a coleta do sangue periférico e da medula óssea, as amostras foram centrifugadas a 2000 rpm por 10 minutos e o plasma separado foi armazenado a -20°C . Para a avaliação das citocinas inflamatórias (IL-8 e TNF), pró-angiogênicas (SDF-1 α , TGF-1 β e VEGF) foi realizado o imunoensaio enzimático (ELISA) conforme descrição do fabricante. A relação dos kits utilizados neste ensaio está descrito abaixo na tabela 2.

Tabela 2. Relação dos kits de ELISA utilizados nas dosagens de citocinas.

Antígenos	Limite de detecção mínimo (pg/ml)	Limite de detecção máximo (pg/ml)
SDF-1α	31,25	2000
VEGF	31,25	2000
TNF	15,6	500
TGF-β	62,5	4000

3.13 Análise Estatística

Os resultados de citometria de fluxo foram avaliados através do programa do citômetro de fluxo CellQuest (FACscalibur) e Summit (DAKO). As análises quantitativas foram avaliadas através do teste estatístico não paramétrico Mann-Whitney, utilizando o programa Prisma Graphpad versão 5.0. Os ensaios de migração, dosagem de citocinas, quantificação de progenitores, invasão e proliferação celular foram avaliados quanto a média/mediana e desvio padrão, utilizando o programa Excel ou Prisma Graphpad versão 5.0.

4 RESULTADOS

4.1 Seleção dos pacientes

A relação dos pacientes falciformes e normais que participaram do estudo está descrita nas tabelas 2 e 3. Esta pesquisa teve a aprovação do comitê de ética em pesquisa da Maternidade Climério de Oliveira/ Universidade Federal da Bahia (Parecer/resolução Aditiva nº 086/2011). Os pacientes foram informados da pesquisa e após serem considerados aptos e concordarem em participar do estudo mediante a assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido foram incluídos na pesquisa. Cerca de 23 pacientes com anemia falciforme foram submetidos a coleta de sangue periférico (10 homens e 13 mulheres) com idades entre 18 e 55 anos (Tabela 3). Os pacientes apresentaram níveis reduzidos de hemoglobina (Hb) e um hematócrito (Ht) diminuído. Os níveis de plaquetas (PLT) apresentaram-se normais, contudo o reticulócitos se mostraram elevados entre os pacientes. Alguns pacientes apresentaram leucocitose e icterícia, como demonstrada pela contagem total de leucócitos (Leuco) e os níveis de bilirrubina total (BT) respectivamente. Cerca de 91% dos pacientes apresentaram outras co-morbidades, dos quais 71% deles relataram a presença de crises álgicas frequentes e 51% de seqüestro esplênico. Dos pacientes que participaram da pesquisa 22 deles faziam uso de ácido fólico e 8 faziam associação medicamentosa com medicamentos como: hidroxiuréia, analgésicos, anti-inflamatórios, anti-metabólicos, anti-reumáticos e anticonvulsivantes.

No período de vigência deste projeto, entre 2009 a 2011 cerca de 17 pacientes (10 pacientes com anemia falciforme e 7 pacientes HbA) foram submetidos ao procedimento de implante de células-tronco na região da osteonecrose (Tabela 4). Destes pacientes 12 do sexo masculino e 5 do sexo feminino, com idades entre 18 e 71 anos. Como descrito na tabela 3 os pacientes apresentaram dados hematológicos e bioquímicos normais. Cerca de 35% dos pacientes

apresentaram osteonecrose bilateral e classificação de Ficat ente 2 e 3. Dos pacientes que participaram do estudo 10 deles faziam uso de ácido fólico e 10 associações medicamentosas com medicamentos como: hidroxiuréria, analgésicos, antiinflamatórios, anticoncepcionais, antidepressivos, anticonvulsivantes, antihipertensivos, antilipêmicos e diuréticos. Após o implante de células-tronco alguns pacientes relataram melhora da dor.

Dados dos pacientes com anemia falciforme dos quais foram coletados os sangues periféricos

Dados Hematológicos/ Bioquímicos												Histórico clínico	Medicamentos em uso
Paciente	Idade	Sexo	Genótipo	Hb (g/dl)	Ht (%)	PLT (x10 ³)	Reticulócitos (%)	Leuco (x10 ³)	BT (mg/dl)	Uréia (mg/dl)	Creat. (mg/dl)		
1	23	M	HbSS	10,2	31	368	2,8	12,1	1,98	13	0,7	Pneumonia, esplenectomizado, crise dolorosa há 1 mês	Ácido fólico e HU
2	32	F	HbSS					9,9				Osteomielite	Ácido fólico e analgésico
3	38	M	HbSS									Hepatite e febre reumática	Ácido fólico/prednisona/ MTX/ hidroxiclороquina
4	50	F	HbSS	7,8	23,6	370		11,1	2,62		0,5	Artrite reumatóide, osteonecrose	Ácido fólico
5	19	M	HbSS	9,7	25,6		17,1	13,7				Colecistectomizado, osteomielite e crises algicas frequentes	Ácido fólico
6	30	F	HbSS	7,1	19,1	293		10,3	3,08			Tuberculose	Ácido fólico
7	21	F	HbSS									Sem queixas	Ácido fólico
8	18	F	HbSS	7,6	22,6	462	3,8	22	2,12			Crise de sequestro esplênico, crises dolorosas frequentes e epilepsia	Ácido fólico e carbamazepina
9	28	M	HbSS	10,1	30,9	189	16,6	16,8	2,2			Cálculo na vesícula	Ácido fólico
10	41	F	HbSS	7,1	20	394	8	14,3		21	0,7	Crises dolorosas frequentes	Ácido fólico
11	31	F	HbSS	8,9	28,5	330		6,5				Pneumonia, crise de sequestro esplênico e crises dolorosas	Ácido fólico

										frequentes	
12	34	F	HbSS	7,8	22	427		8,4	4,39	Osteonecrose, crise de sequestro esplênico, asma e crises dolorosas frequentes	Ácido fólico/paracetamol/ tandrilax/ amoxicilina
13	55	F	HbSS	9,5	26,6	329			2,4	Sem queixas	Ácido fólico
14	44	M	HbSS							Crise de sequestro esplênico e crises dolorosas frequentes	Ácido fólico
15	39	F	HbSS	9	25	309	6,2	10,9	9,88	Crise de sequestro esplênico e crises dolorosas frequentes	Ácido fólico
16	28	M	HbSS	10,2	29,4	459	7,4	8,6		Crise de sequestro esplênico, osteonecrose e crises dolorosas frequentes	Ácido fólico e HU
17	25	M	HbSS	7,5	20	308	11,3	15,2	15,7	Pneumonia, crise de sequestro esplênico, úlceras e crises dolorosas frequentes	Ácido fólico
18	43	M	HbSS	8,4	26	380		8	2	Crise de sequestro esplênico e crises dolorosas frequentes	Ácido fólico
19	43	F	HbSS	5,1	15,1	725		10		Crise de sequestro esplênico e crises dolorosas frequentes	Ácido fólico
20	37	F	HbSS	6,8	22,2	335		11,3		Crise de sequestro esplênico e crises dolorosas frequentes	Ácido fólico
21	26	F	HbSS	8,4	26	684		9,9		Crises dolorosas frequentes, litíase	

									biliar e varizes		
22	33	M	HbSS	10,9	30,2	172		10,2	Crise de sequestro esplênico, priapismo e crises dolorosas frequentes	Ácido fólico e tylex	
23	34	M	HbSS	7,9	25,8			15,86	2,3	Crises dolorosas frequentes e úlceras	Ácido fólico e dipirona

Tabela 3. Relação dos dados hematológicos, bioquímicos e histórico clínico dos pacientes com anemia falciforme que foram submetidos a coleta de sangue periférico.

Dados dos pacientes controles e com anemia falciforme e dos quais foram coletadas as medulas ósseas

Paciente	Idade	Sexo	Genótipo	Fator de risco/ diagnóstico final	Dados Hematológicos/ Bioquímicos								Medicamentos em uso	Evolução do quadro clínico após implante das CMMOs
					Hb (g/dl)	Ht (%)	PLT (x10 ³)	TP (%)	TTPa (")	Glic (mg/dl)	Uréia (mg/dl)	Creat (mg/dl)		
1	18	F	HbSS	ON* femur direito Ficat 3	8,1	27	314	100	-	-	18	0,7	Acido fólico	Nega dor
2	26	M	HbSS	ON femur direito Ficat 2	9	24	322	64		77	22	0,6	Tegretol e ácido fólico	
3	42	M	HbSS	Ficat 2 (E)/Ficat 3 (D) implante no E	10,4	31,2	246			80	34	0,8	Ácido fólico	
4	50	F	HbSS	ON ficat 1	9,5	27	435	95		93	15	0,4	Ácido fólico	
5	15	F	HbSS	ON cabeça do fêmur direito	9,2	26,1	428	90	25	70	16	0,6	Ácido fólico	
6	26	M	HbSS	ON cabeça femoral	11,5	33,7	403	115	54,3	69,4	23,8	0,66	HU** e acido fólico	
7	31	F	HbSS	ON cabeça do fêmur esquerdo									Ácido fólico e ACO injetável	
8	33	M	HbSS	ON bilateral/ implante no D	8,6	28	425	80	35	76	15	0,7	HU e ácido fólico	
9	25	M	HbSS	ON bilateral	9,2	27	303	71		101	14	1,1	HU, ácido fólico, tramal, fluoxetina	Após 2 meses relatou melhora da dor
10	25	M	HbSS	ON bilateral	11,5	35,5	215	84	33,8	81	26	2,6	HU e ácido fólico	Relata redução da dor
11	54	M	HbA	ON do femur D	16	48	187	86	28	101	25	1	Atorvastatina/ atenolol/ HCTZ	-

12	57	M	HbA	ON idiopática na cabeça do femur D	14	42	255	-	-	86	30,5	1,1	Sinvastatina e analgésicos	-
13	71	M	HbA	ON idiopática bilateral/ ficat 2	13,6	38,7	230	111	29	83	36	0,8		
14	42	F	HbA	ON femur E Ficat 2 idiopática	11,4	34,6	142			95	42	0,8	Nimesulida e diclofenaco	
15	39	M	HbA	Ficat 2 (E)/Ficat 3 (D) implante no E	15,8	49	265			82	45	0,7	Rivotril e atenolol	Relata dor desde o procedimento
16	52	M	HbA	ON cabeça do fêmur direito idiopática	14,1	42	241	89	26					
17	42	M	HbA	ON de tálus secundária a trauma	14,6	44	207	70	33					

Tabela 4. Relação dos dados hematológicos, bioquímicos e evolução do quadro clínico dos pacientes com anemias falciformes e normais que foram submetidos ao implante de CMMOs. * ON= Osteonecrose, ** HU= Hidroxiuréia.

4.2 Quantificação das CPEs por Citometria de Fluxo

Frequência das CPEs no sangue sangue periférico e medula óssea de pacientes falciformes

Um total de 28 amostras de sangue periférico foram coletadas neste estudo (20 pacientes HbSS e 8 indivíduos normais), 10 amostras de medula óssea de pacientes falciformes e 12 amostras de sangue de cordão umbilical. Na tabela 5, 6 e 7 foram descritas a avaliação de todas as subpopulações encontradas no sangue periférico, na medula óssea e sangue de cordão umbilical.

Frequência das subpopulações celulares encontradas no Sangue Periférico de pacientes normais e falciformes						
Paciente	Genótipo	Leuco X10 ³	Subpopulações celulares			
			CD34 ⁺ /45 ⁺	CD34 ⁺ /CD133 ⁺	CD34 ⁺ /CD133 ⁺ /KDR ⁺	CD34 ⁺ /CD133 ⁺ /45 ^{low/-}
1	HbSS	11	1155	32	86	250
2	HbSS	7	613	0	0	51
3	HbSS	6,3	504	1078	883	207
4	HbSS	6,6	462	356	132	185
5	HbSS	17	3096	986	408	633
6	HbSS	11	2354	68	92	47
7	HbSS	11	2091	63	63	121
8	HbSS	11	2816	839	60	968
9	HbSS	8,2	628	0	0	0
10	HbSS	10	220	0	0	60
11	HbSS	6,3	567	0	0	0
12	HbSS	9,6	1071	38	19	77
13	HbS	13	4218	0	26	130
14	HbSS	12	617	696	396	48
15	HbSS	5	136	68	181	18
16	HbSS	7,6	152	149	250	0
17	HbSS	14	502	310	1359	67
18	HbSS	17	NF*	2304	353	NF*
19	HbSS	16	NF*	4437	4522	NF*
20	HbSS	17	1323	333	247	41
21	HbA	8	347	0	0	32
22	HbA	6,8	694	538	0	150
23	HbA	9,7	246	982	35	214
24	HbA	6,7	54	195	120	24
25	HbA	5	39	875	70	59
26	HbA	7	157	356	276	29
27	HbA	7	70	660	1078	0
28	HbA	7,4	NF*	0	17	NF*

*NF= Não foi feita a avaliação dessa subpopulação celular

Tabela 5. Frequência das subpopulações de células CD34⁺/CD45⁺, CD34⁺/CD133⁺, CD34⁺/KDR⁺/CD133⁺ e CD34⁺/KDR⁺/CD45^{low/-}. Encontradas no sangue periférico de pacientes com anemia falciforme e indivíduos normais.

Frequência das subpopulações celulares encontradas na medula óssea de pacientes falciformes						
Paciente	Genótipo	Leuco X10 ³	Subpopulações celulares			
			CD34 ⁺ /45 ⁺	CD34 ⁺ /CD133 ⁺	CD34 ⁺ /CD133 ⁺ /KDR ⁺	CD34 ⁺ /CD133 ⁺ /45 ^{low/-}
1	HbSS	17	940	27967	74	0
2	HbSS	13	0	52	0	0
3	HbSS	30	394	179	1617	5041
4	HbSS	20	2066	89	1336	82
5	HbSS	16	544	420	804	301
6	HbSS	20	567	1546	823	385
7	HbSS	70	560	280	560	1680
8	HbSS	26	76	958	779	152
9	HbSS	14	4726	489	164	225
10	HbSS	17	940	NF*	NF*	9

*NF= Não foi feito a avaliação dessa subpopulação celular

Tabela 6. Frequência das subpopulações de células CD34⁺/CD45⁺, CD34⁺/CD133⁺, CD34⁺/KDR⁺/CD133⁺ e CD34⁺/KDR⁺/CD45^{low/-}, encontradas na medula óssea de pacientes com anemia falciforme.

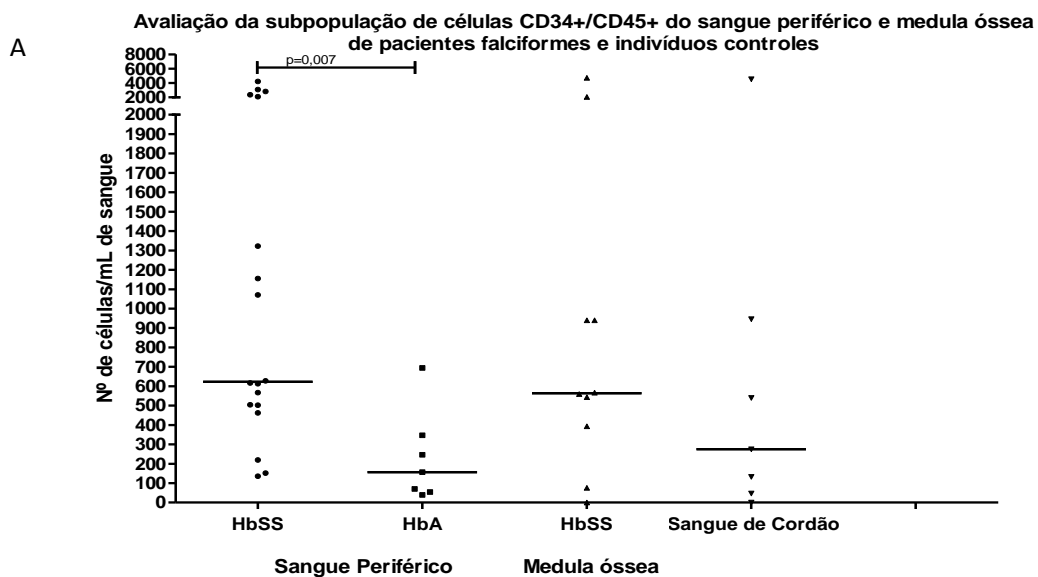
Frequência das subpopulações celulares encontradas no Sangue de Cordão Umbilical de Indivíduos Normais						
Paciente	Genótipo	Leuco X10 ³	Subpopulações celulares			
			CD34 ⁺ /45 ⁺	CD34 ⁺ /CD133 ⁺	CD34 ⁺ /CD133 ⁺ /KDR ⁺	CD34 ⁺ /CD133 ⁺ /45 ^{low/-}
1	HbA	11	946	2480	66	0
2	HbA	13	47	8450	26	0
3	HbA	10	133	7190	2133	33
4	HbA	12	0	7800	2046	24
5	HbA	9,3	275	174	74	215
6	HbA	6,7	540	59	147	19
7	HbA	10	4550	49	98	0
8	HbA	8,3	NF*	9099	182	NF*
9	HbA	12	NF*	3573	247	NF*
10	HbA	21	NF*	21367	524	NF*
11	HbA	16	NF*	10414	379	NF*

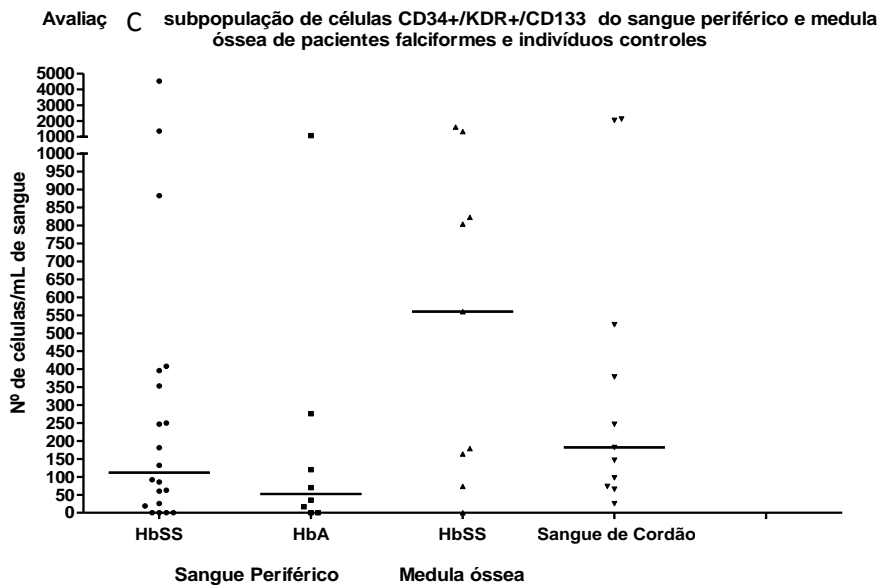
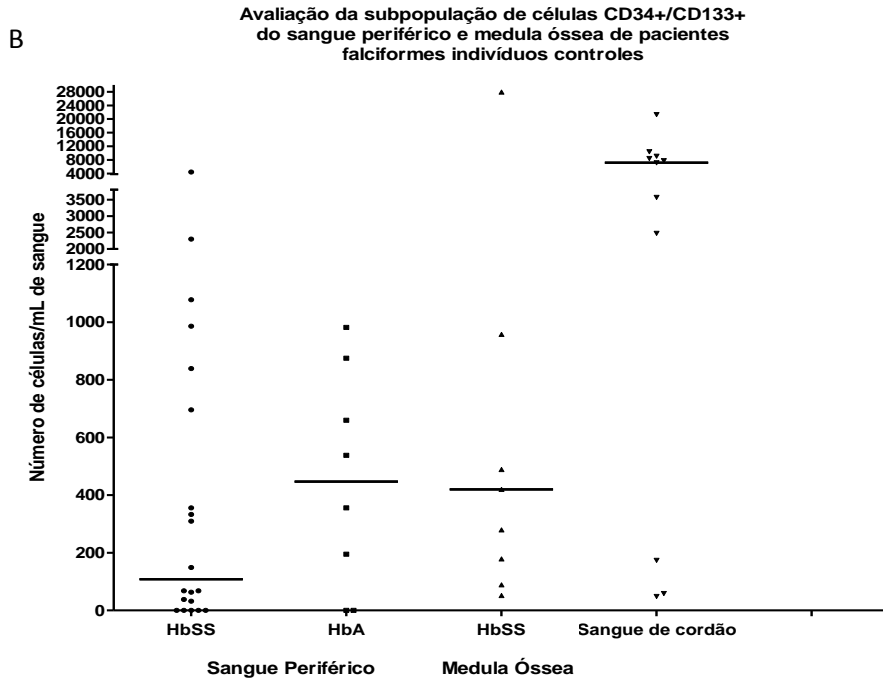
*NF= Não foi feito a avaliação dessa subpopulação celular

Tabela 7. Frequência das subpopulações de células CD34⁺/CD45⁺, CD34⁺/CD133⁺, CD34⁺/KDR⁺/CD133⁺ e CD34⁺/KDR⁺/CD45^{low/-}, encontradas no sangue de cordão umbilical de indivíduos normais.

Foi identificado um número maior de células CD34⁺/CD45⁺ no sangue periférico de pacientes falciformes comparado aos controles (p<0,05) e no sangue de cordão umbilical (Figura 9A). De acordo com os resultados obtidos foi observada uma variação na frequência das

subpopulações celulares investigadas. Segundo os resultados foi detectada uma freqüência mais elevada de células $CD34^+/CD133^+$ no sangue periférico e na medula óssea de indivíduos controles quando comparados aos pacientes falciformes, contudo sem significância estatística ($p>0,05$). No entanto foi observado diferenças significativas entre freqüência de células $CD34^+/CD133^+$ no sangue falciforme quando comparada ao sangue de cordão umbilical ($p<0,05$) (Figura 9B). Também foi identificado um discreto aumento das populações de células $CD34^+/KDR^+/CD133^+$ e $CD34^+/KDR^+/CD45^{low/-}$ nesses pacientes comparados aos controles normais, contudo sem significância estatística ($p>0,05$) (Figura 9C e 1D). Na medula óssea foram identificadas freqüências elevadas das células $CD34^+/KDR^+/CD45^{low/-}$ nos pacientes falciformes quando comparados aos pacientes controles, contudo sem significância estatística como descrito na figura 9D ($p>0,05$). Nenhuma diferença estatisticamente significativa foi encontrada na freqüência das células $CD34^+/KDR^+/CD133^+$ neste estudo (Figura 9C) ($p>0,05$). Na medula óssea normal foi identificado um número maior de células $CD34^+/CD45^+$ comparado a medula falciforme, sem significância estatística (Figura 9A) ($p>0,05$). Também foi detectado um número maior de células de todas as subpopulações investigadas na medula óssea normal e falciforme comparado a freqüência no sangue de cordão umbilical.





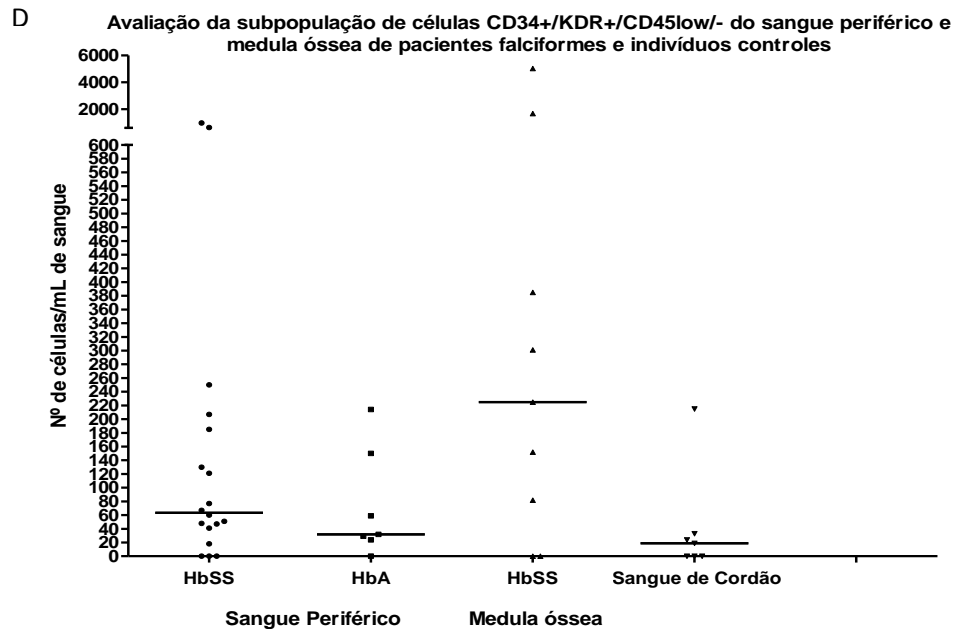


Figura 8. Frequência das subpopulações de células CD34⁺/CD45⁺ (A), CD34⁺/CD133⁺ (B), CD34⁺/KDR⁺/CD133⁺ (C), CD34⁺/KDR⁺/CD45^{low/-} (D), encontradas no sangue periférico e medula óssea de pacientes falciformes e no sangue de cordão umbilical de indivíduos normais. A barra erros representa a mediana dos valores obtidos (Sangue periférico n=28 , 20 pacientes HbSS e 8 controles, MO = 10 pacientes HbSS e 12 sangues de cordões umbilicais) (Mann-Whitney).

4.3 Dosagem das citocinas

Os níveis plasmáticos das citocinas TGF- β , VEGF, SDF-1 α e TNF do sangue periférico dos pacientes falciformes e indivíduos controles foram determinados através do ELISA. Na determinação do TGF- β foram analisados um total de 49 amostras de plasma (36 pacientes HbSS e 13 pacientes HbA). Para a dosagem de VEGF foram analisadas 44 amostras de sangue periférico (31 HbSS pacientes e 13 indivíduos HbA). Na dosagem de SDF foram avaliadas 41 amostras de sangue periférico (30 pacientes HbA e 11 indivíduos HbA). Na determinação do TNF foram analisadas 39 amostras (28 pacientes HbSS e 11 pacientes HbA).

Na amostra de sangue periférico observou-se níveis mais elevados de TGF- β no plasma de indivíduos controles quando comparados aos pacientes falciformes, contudo sem significância estatística ($p > 0,05$) (Figura 10A). Neste estudo nenhuma diferença foi encontrada entre os níveis plasmáticos de TNF e VEGF de pacientes falciformes e indivíduos controles ($p > 0,05$) (Figura 10C, e 10D). De acordo com os resultados foram identificados níveis discretamente

elevados de SDF-1 α tanto no plasma periférico de pacientes falciformes quando comparados aos controles, sem significância estatística ($p>0,05$) (Figura 10B).

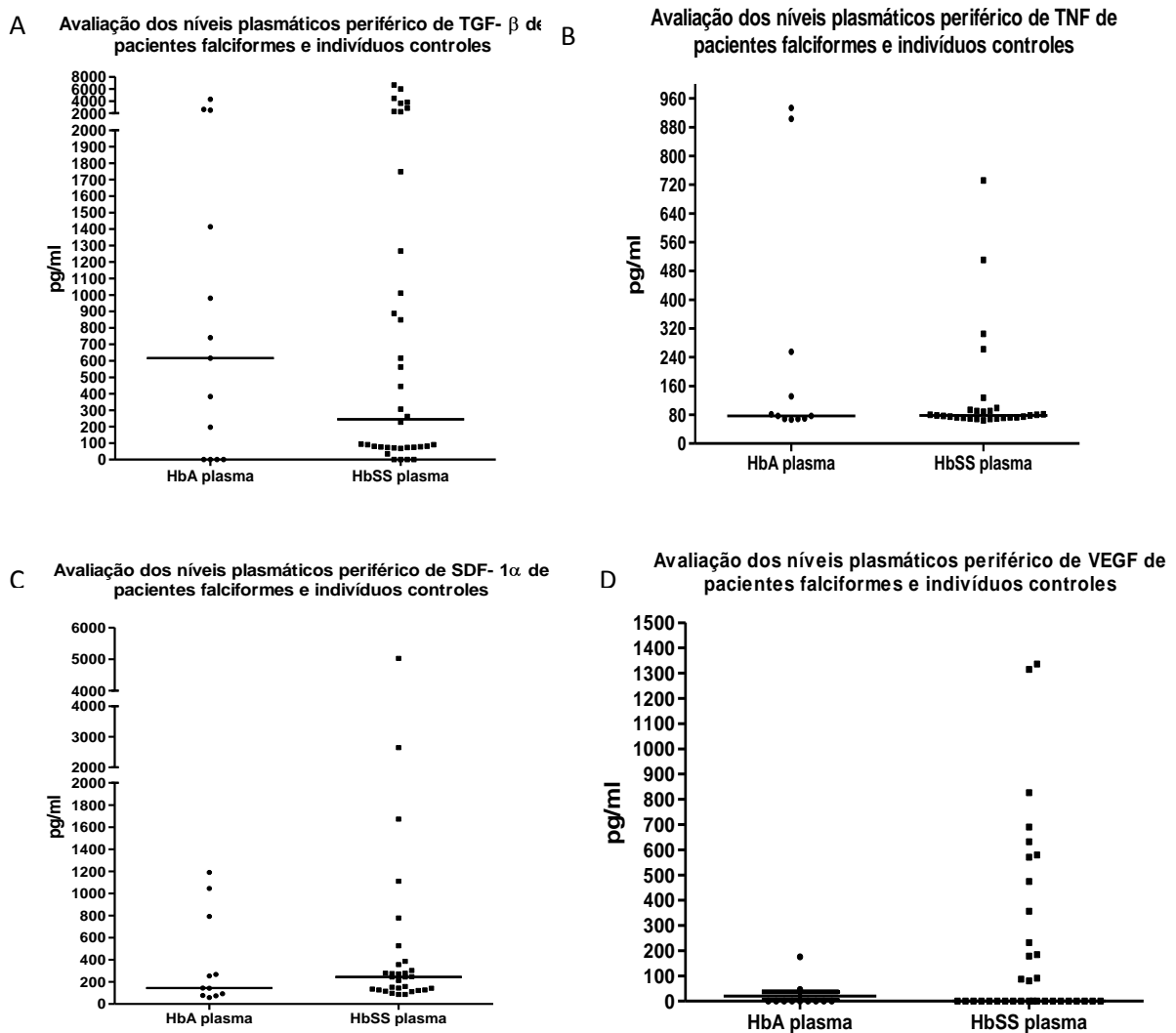


Figura 9. Dosagem de TGF- β (A), TNF (B) SDF-1 α (C) e VEGF (D), no sangue periférico e medula óssea de pacientes falciformes e indivíduos normais por ELISA. A barra de erros representa a mediana dos valores obtidos (Mann-Whitney).

4.4 Isolamento das CPEs e Avaliação Morfológica

As CPEs foram isoladas a partir das células mononucleares e cerca de 2×10^7 células foram plaquedas em placas de cultura de 6 poços inicialmente contendo colágeno de tipo I na presença de EGM-2. Após 7 dias de cultivo foi possível observar o aparecimento das primeiras colônias (clusters) de células (Figura 11).

O sangue de cordão umbilical foi empregado como controle positivos das CPEs. Quando cultivadas sobre filme de colágeno as CPEs apresentaram morfologia típica de células endoteliais achatada com formato cubóide (Figura 11). As células apresentam núcleo achatado e proeminente, assim como os nucléolos facilmente detectáveis. Inicialmente detectaram-se “clusters” que originaram monocamadas com áreas de baixa e alta densidade. Contudo, após cultivo prolongado, as monocamadas não apresentaram regiões com aspecto tubular. As células isoladas de medula óssea apresentaram uma morfologia fibroblastóide típica de células mesenquimais da medula óssea.

CPEs isoladas da fração de células mononucleares da MO apresentaram uma morfologia típica. A partir dessa análise todas as culturas foram mantidas na presença de colágeno tipo I. As culturas também formaram-se a partir de “clusters” de células com capacidade proliferativa diferenciada, também formando uma monocamada com áreas de baixa e alta densidade. Contudo, após cultivo prolongado, as monocamadas não apresentaram estrutura tridimensional, com aspecto tubular. As células isoladas medula óssea apresentaram uma morfologia fibroblastóide, típica de células estromais da medula óssea

A partir das fração de células mononucleares do sangue periférico tentou-se isolar as CPEs desse compartimento. Inicialmente formaram-se pequenos “clusters” de células, com formato arredondado e irregular, semelhante a monócitos/ macrófagos. Esses “clusters” apresentaram baixa capacidade proliferativa, sem formação de monocamada e após 14 dias em cultivos as células foram eliminadas da cultura como demonstrado na figura 11F.

A figura 8 representa as CPEs isoladas do sangue de cordão umbilical sobre uma camada de colágeno após 7, 14 e 21 dias de cultivo (Figura 11A-C). As figuras confirmam a morfologia característica das CPEs em forma de “cobblestone”. As células isoladas da medula óssea e após 7 e 10 dias de cultivo estão representadas na figura 11D e E. As figuras destacam a morfologia fibroblastóide das células cultivadas, semelhante às células estromais da medula óssea.

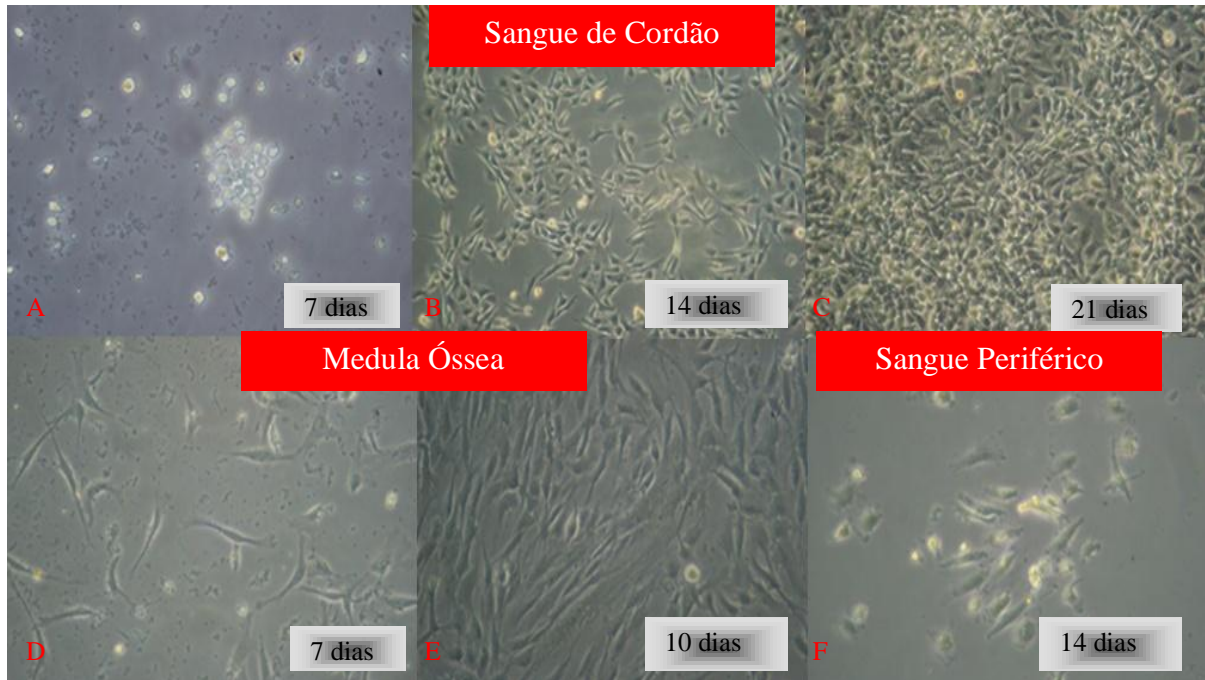


Figura 10. Análise morfológica das CPEs derivadas de sangue de cordão umbilical após 7, 14 e 21 dias de cultivo e células da medula óssea após 7 e 10 dias de cultivo. A figura F representa as células derivadas do sangue periférico após 14 dias de cultivo (Objetiva 10X).

4.5 Análise Funcional

Curva de Proliferação

A proliferação das células da medula óssea controle (HbA) (n=2) e falciforme (HbSS) (n=4) foi avaliada através da contagem do número total de células. As células foram incubadas por quatro dias na presença de 10% e em diferentes concentrações do plasma autólogo. As células apresentaram capacidade proliferativa ao longo do tempo. As CPEs de medula óssea HbA, mantidas em condições basais, apresentaram uma taxa de proliferação constante e o número total de células não se modificou após 72h de cultivo. As condições de cultivo com a presença de suplementos enriquecidos com fatores de crescimento levaram ao aumento do número total de células. As CPEs de pacientes HbSS apresentaram uma taxa proliferativa constante e o número de células aumentou após 72h de cultivo em condições basais e na presença de suplementos (Figura 12).

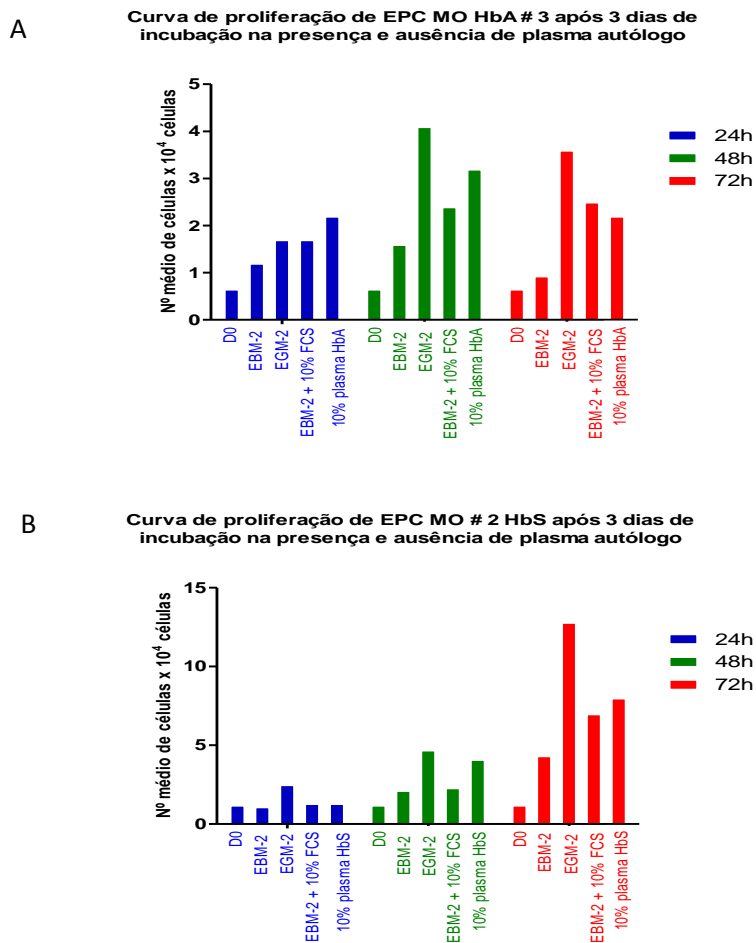
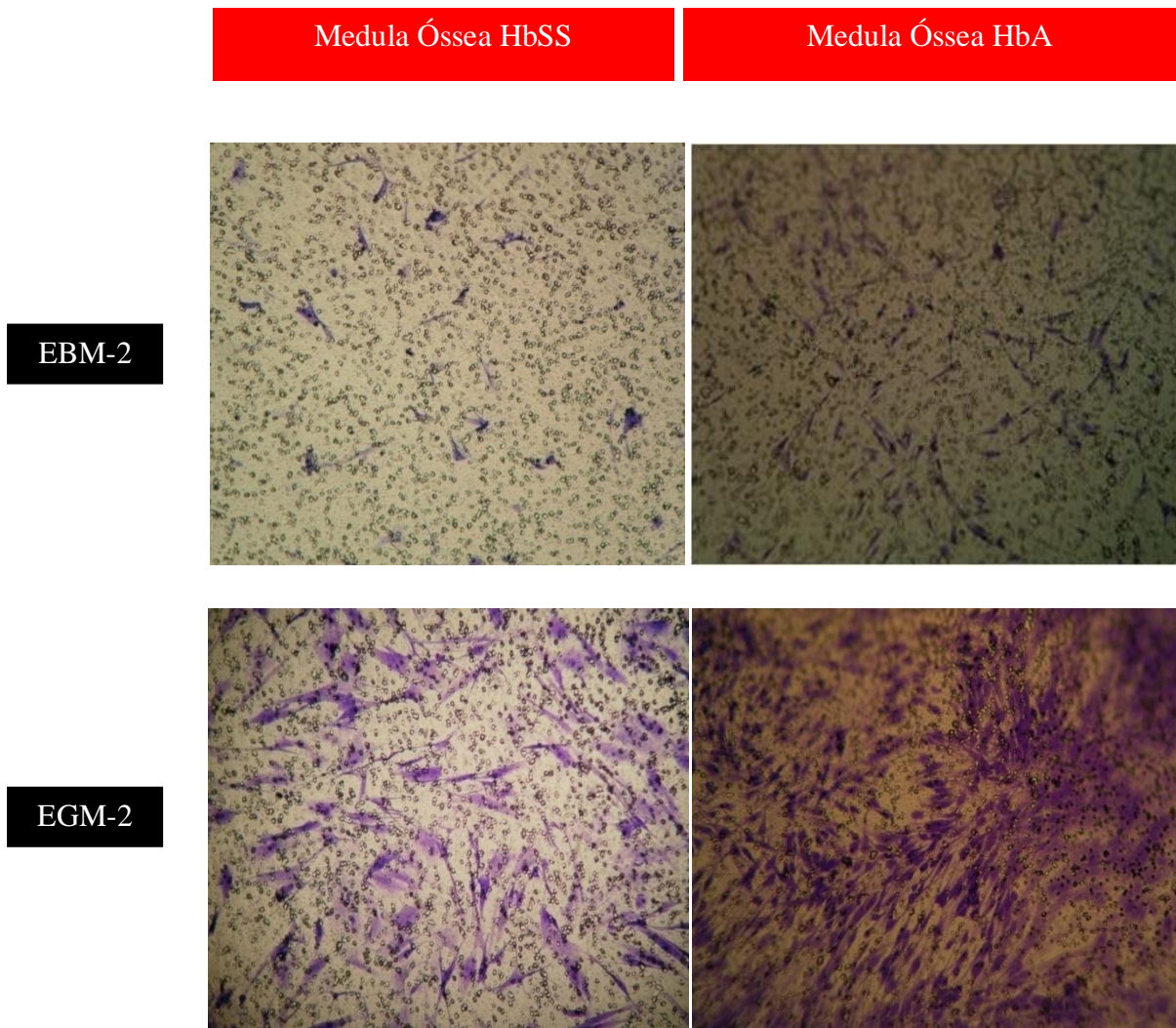


Figura 11. Ensaio de proliferação utilizando contagem com azul de tripan em câmara de Neubauer das CPEs da medula óssea HbA (A) e falciforme (B) na presença de 10% plasma autólogo após 72h de incubação.

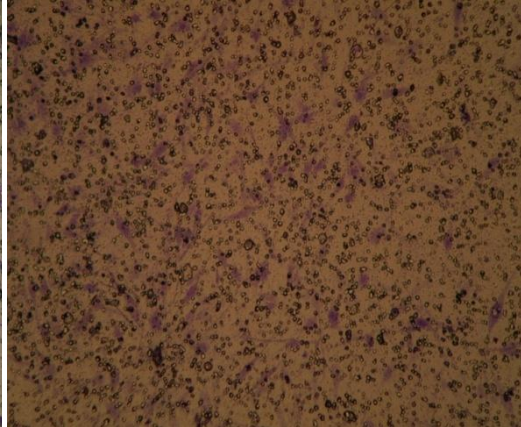
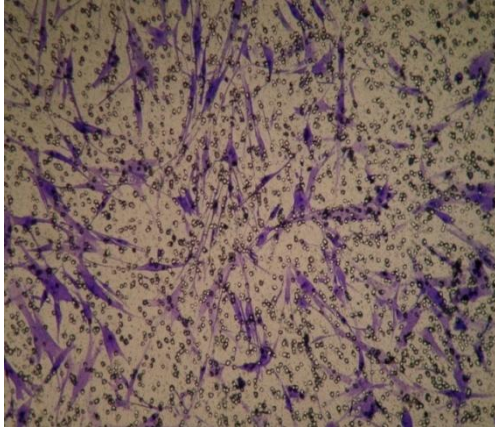
Invasão Celular

Para avaliação da capacidade invasiva as células derivadas da medula óssea de pacientes normais (HbA) (n=3) e pacientes falciformes (HbSS) (n=3) foram cultivadas e mantidas até a confluência celular. Após a confluência as células foram tripsinizadas e plaqueadas na parte superior da câmara na densidade celular de $2,5 \times 10^4$ células/poço. As células dos pacientes normais e falciformes foram cultivadas na presença de EBM-2 e 10% de plasma HbA e 10% de plasma HbS. Foram utilizados neste experimento como controle negativo o EBM-2 e como controle positivo EGM-2. Em seguida, as células foram incubadas por 24h na estufa no ambiente de 5% de CO₂ e 95% de umidade. Após a incubação as células foram lavadas e fixadas com solução de 4% de paraformoldeído, coradas com violeta de genciana e

observadas ao microscópio óptico. O número de células foi estimado utilizando um quadrante da câmara de Neubauer, uma vez este possui um valor conhecido de 1mm^2 . O total de células contadas no quadrante foi ajustado pelo fator de escala de área total (total area scale factor – ASF). O ASF foi calculado considerando a área da figura pela área da amostra. Foram escolhidos cinco campos representativos do ensaio e procedido a contagem das células. O número de células encontradas foi ajustado pelo fator ASF. Os resultados desse ensaio revelaram que as células da medula óssea de pacientes HbA e HbS foram capazes de invadir componentes da matriz extracelular e migrar através de microporos em direção a fatores quimiotáticos previamente identificados (Figura 13 e Figura 14).



EBM-2 +
10% plasma
HbA



EBM-2 +
10% plasma
HbS

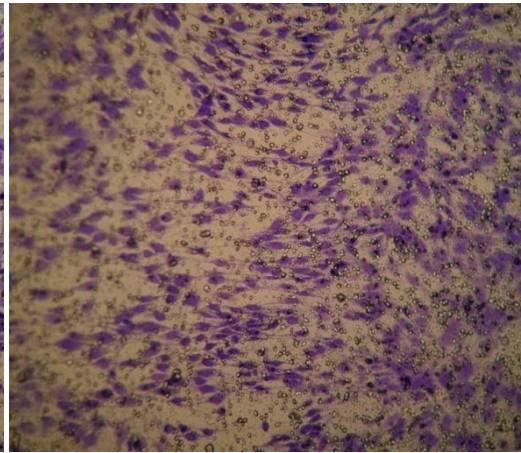
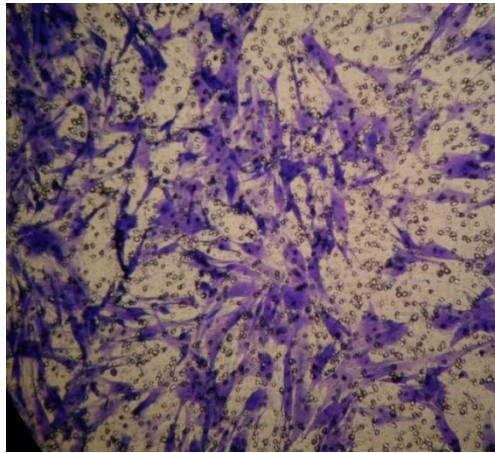
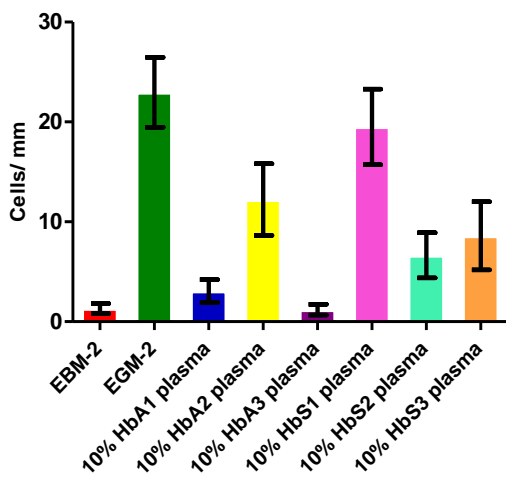


Figura 12. Ensaio de invasão celular em câmara de Boyden modificada com células derivadas de medula óssea falciforme e normais após 24h de incubação com plasma normal (HbA) e falciforme (HbSS) (Objetiva 10x).

Avaliação da capacidade invasiva de células derivadas da medula óssea de pacientes HbA na presença de plasmas HbA ou HbS



Avaliação da capacidade invasiva de células derivadas da medula óssea de pacientes HbS na presença de plasmas HbA ou HbS

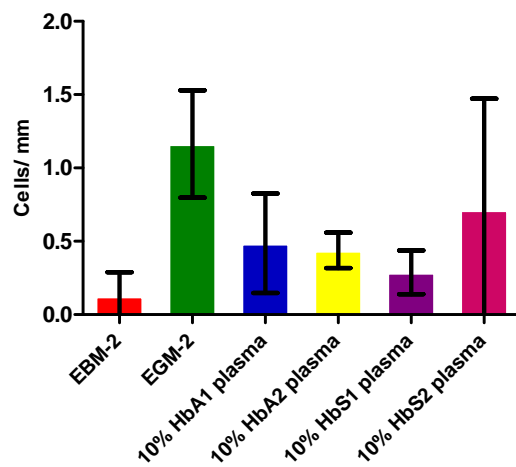


Figura 13. Ensaio de invasão celular com células derivadas de medula óssea falciforme e normais após 24h de incubação com plasma normal (HbA) e falciforme (HbSS). O gráfico representa o número médio de células e a barra erros o desvio padrão encontrado.

Tubulogênese

As células derivadas da medula óssea (n=5) e do sangue de cordão umbilical (n=5) foram tripsinizadas e plaquedadas na densidade celular de 2×10^4 células/poço sobre uma camada de matrigel e incubada por 6h temperatura de 36°C em um ambiente de 5% de CO_2 e 95% de umidade. Após o período de incubação das células foram fixadas com solução de 4% de paraformaldeído, coradas com violeta de genciana e observadas ao microscópio invertido. Os resultados obtidos demonstraram que as células da medula óssea de pacientes falciformes são capazes de se organizar e formar estruturas semelhantes a túbulos, contudo morfológicamente distintos das estruturas formadas pelas CPEs de sangue de cordão umbilical, como demonstrado pela figura 15.

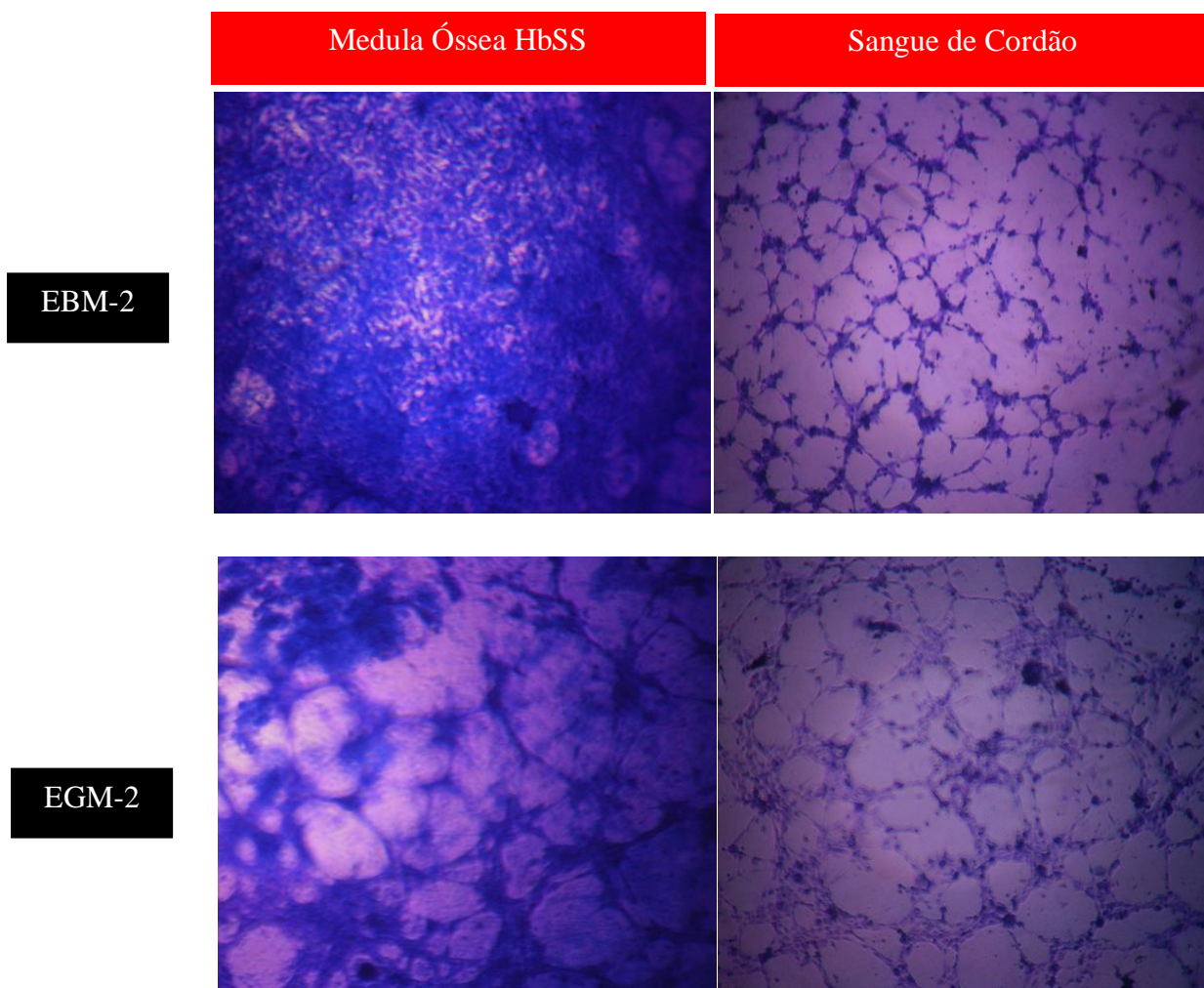


Figura 14. Ensaio de tubulogênese em matrigel utilizando células da medula óssea falciforme e CPEs de sangue de cordão umbilical (Objetiva de 10x).

4.6 Caracterização Fenotípica: Imunocitoquímica

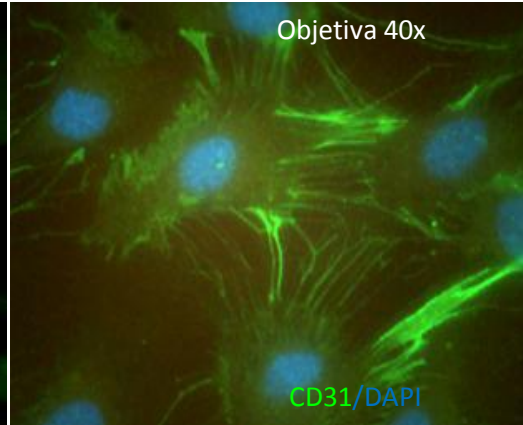
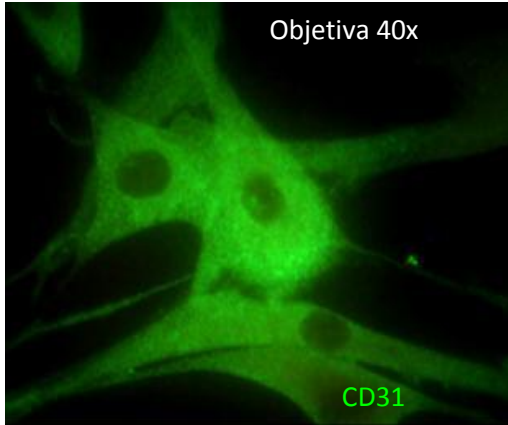
Microscopia de Fluorescência Convencional

A técnica de imunocitoquímica foi utilizada para localizar proteínas características na população de CPEs em estudo. As células fixadas foram imunolocalizadas para UEA-I através de imunofluorescência direta, e para o fator de von Willebrand, CD31, CD144 (VE-caderina), Vimentina e alfa de músculo liso através de imunofluorescência indireta. Os resultados dessas marcações estão demonstrados na figura 16. A imunoreatividade das células da medula óssea apresentou um padrão de marcação difuso (atípica) para a proteína CD31 quando comparada ao padrão das células do sangue de cordão umbilical, em que detectou-se uma marcação membranar e periférica no citoplasma. A imunodeteção da proteína VE-caderina nas células da medula óssea demonstrou um padrão de marcação variável, com baixa frequência na população estudada, porém típico ao descrito para as CPEs do sangue de cordão umbilical. As células da medula óssea apresentaram marcação positiva para UEA-I quando comparadas ao controle positivo (células CPEs de sangue de cordão). Algumas células de amostras de medula óssea apresentaram marcação positiva para Fator de von Willebrand, contudo apresentaram um padrão de marcação com número de grânulos reduzidos, quando comparados às células CPEs de sangue de cordão. Observou-se que as células da medula óssea foram positivas para a proteína vimentina, proteína da família de filamentos intermediários presente no citoesqueleto das células de origem mesenquimal, enquanto as células de sangue de cordão apresentaram uma fraca marcação, equivalente ao controle negativo. Segundo os resultados obtidos ambas as células de medula óssea e sangue de cordão umbilical foram negativas para α -actina de músculo liso (dados não mostrados).

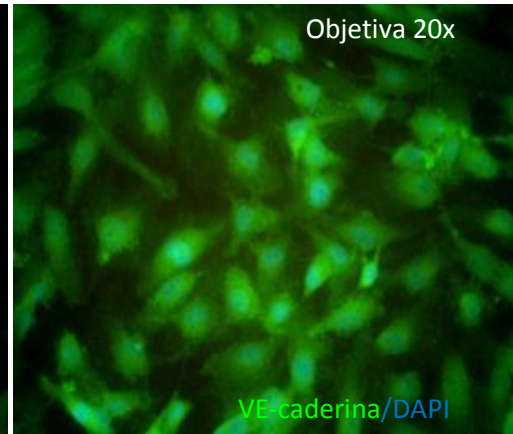
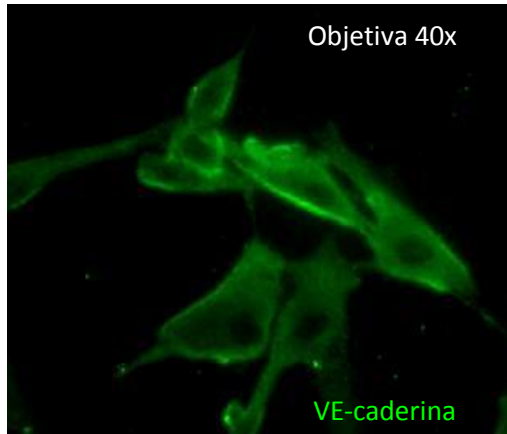
Medula Óssea HbSS

Sangue de Cordão

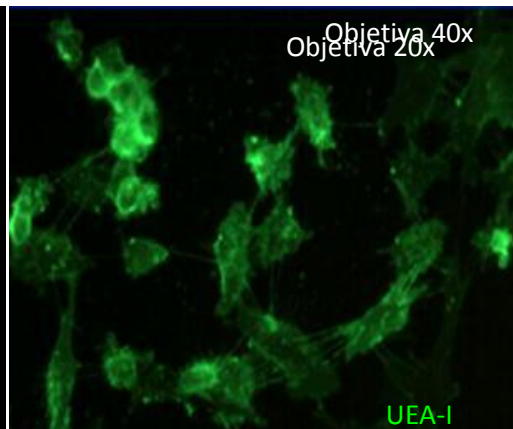
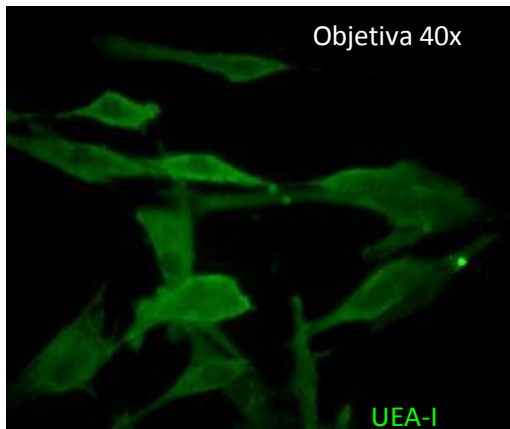
CD31



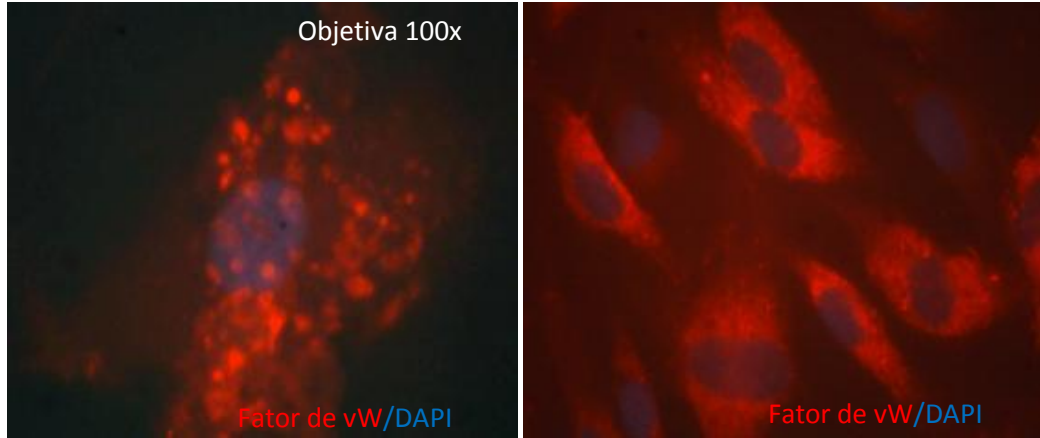
VE-Caderina



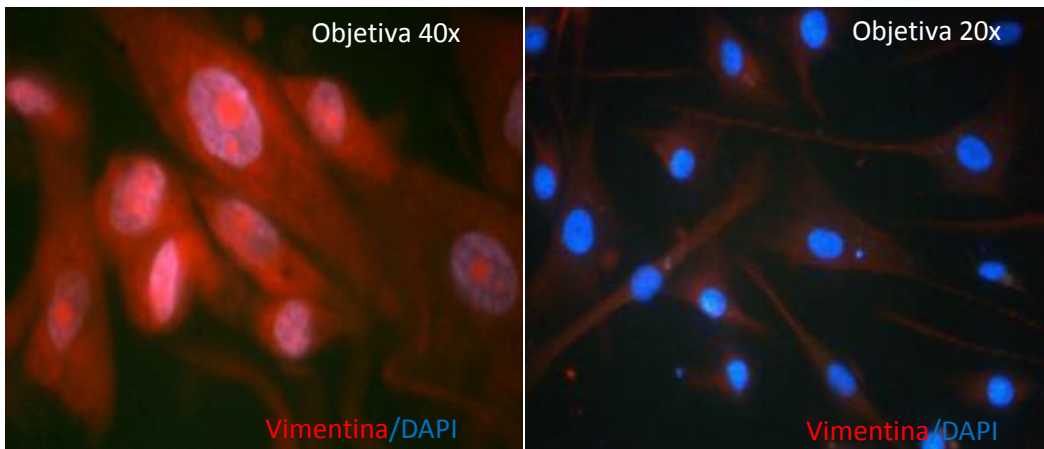
UEA-1



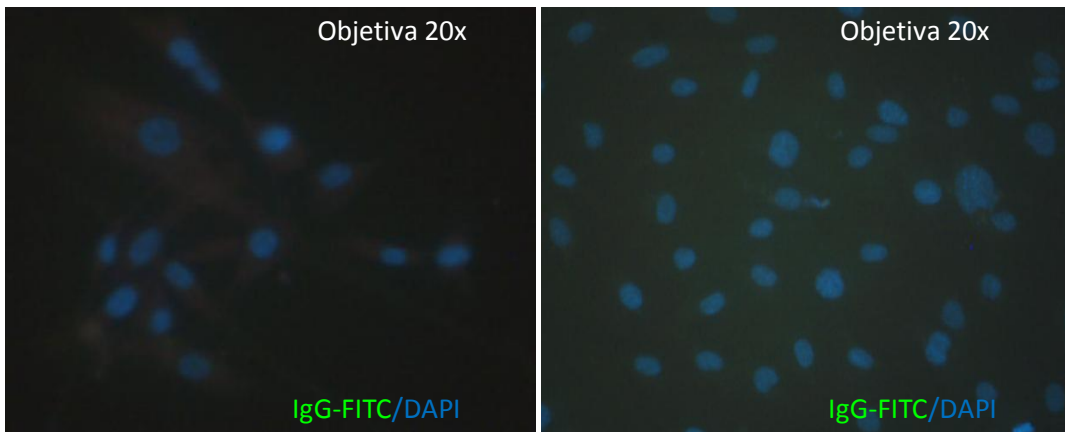
Fator de vW



Vimentina



Controle
Camundongo



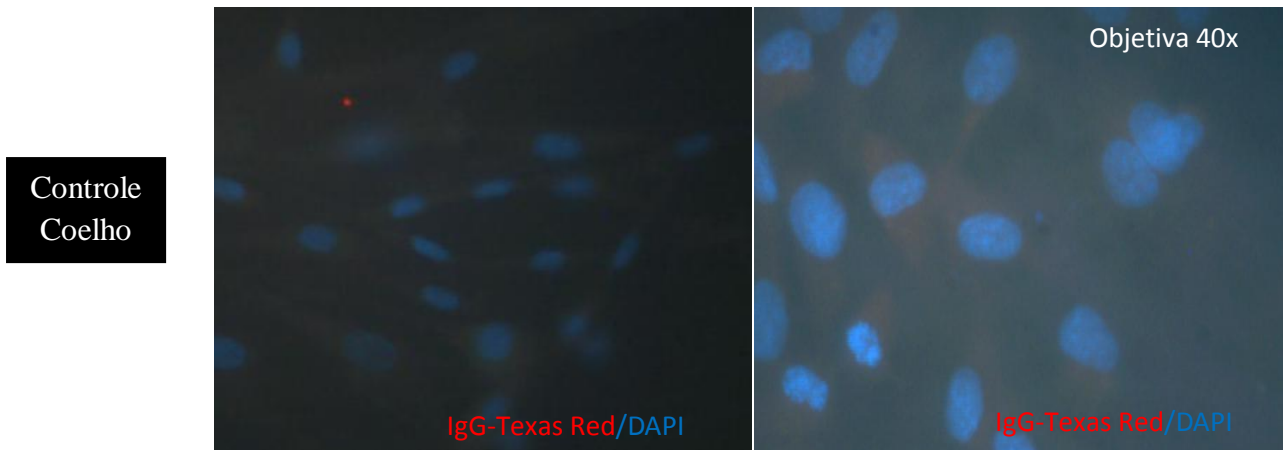
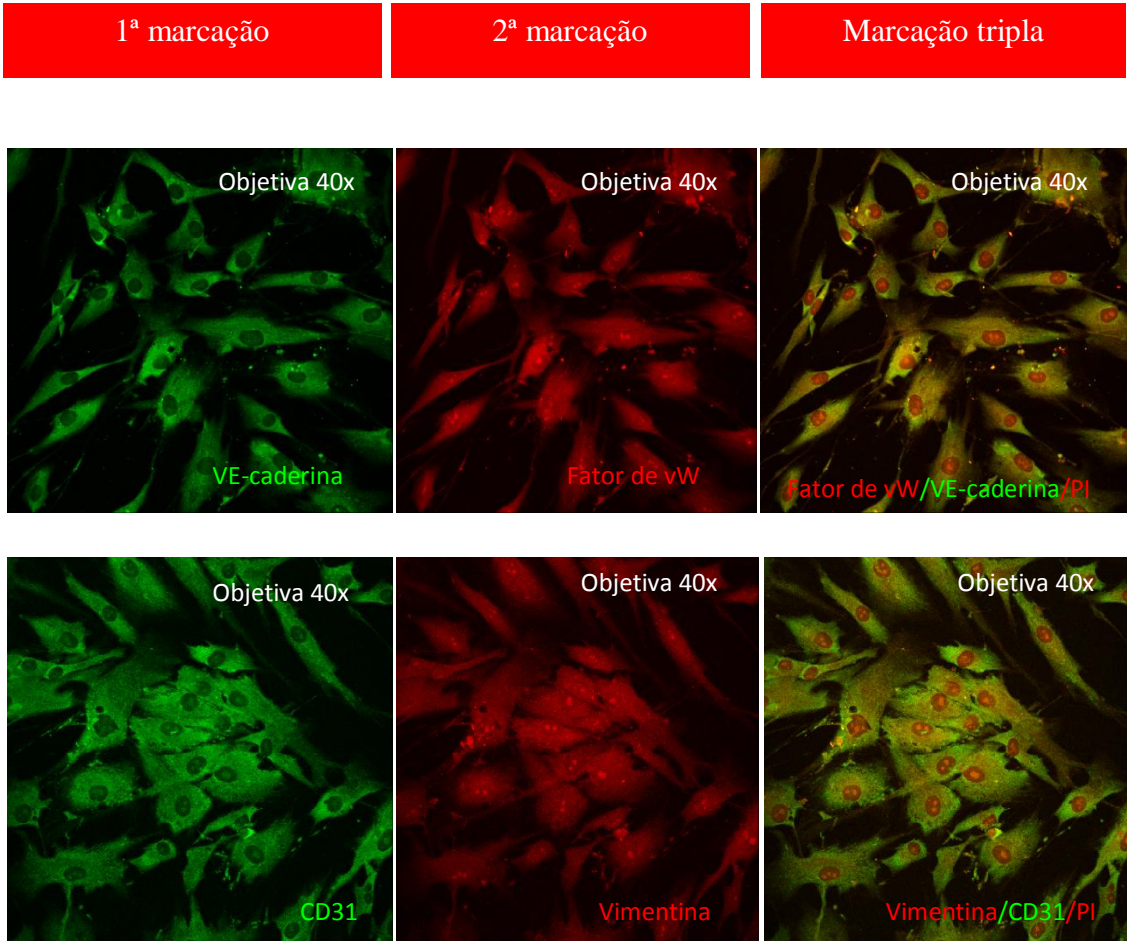


Figura 15. Marcação para CD31, VE-caderina, UEA-I, Fator de Von Willebrand, Vimentina e α -actina de músculo liso de células da medula óssea de pacientes falciforme e sangue de cordão umbilical.

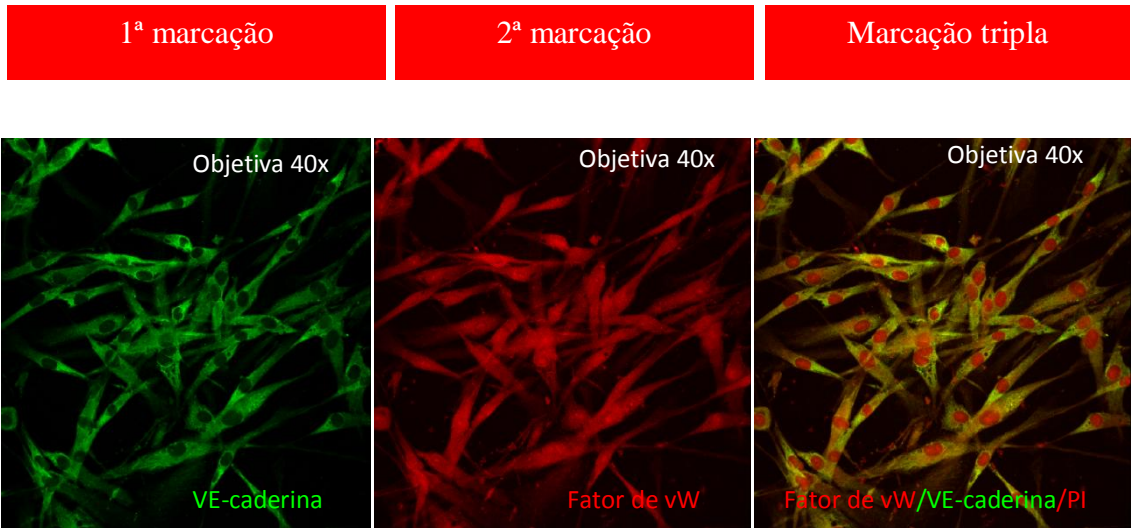
Microscopia Confocal

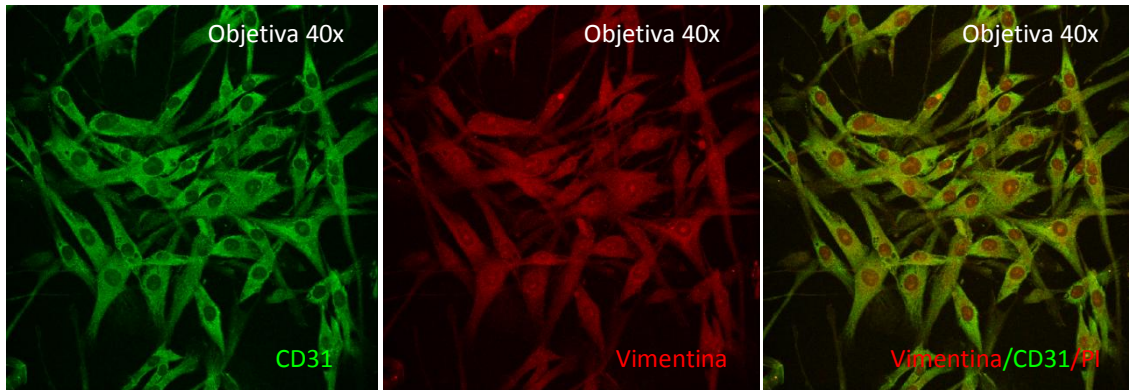
Após a marcação para a imunofluorescência às células derivadas da medula óssea normal e falciforme e as CPEs de sangue de cordão umbilical marcadas foram analisadas através do microscópio confocal modelo SP5, marca Leica no INMETRO (INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, QUALIDADE E TECNOLOGIA) no Rio de Janeiro, para uma melhor avaliação das marcações (figura 17). De acordo com os resultados foram observadas, de forma atípica, marcações difusas em todas as células, corroborando as observações feitas em microscópio óptico convencional. As CPEs de sangue de cordão umbilical foram submetidas ao sistema de hipóxia durante 24h, e após a incubação foi observado que algumas células apresentaram a marcação clássica de uma célula endotelial diferenciada para CD31, uma marcação membranar juncional.

Células derivadas da medula óssea HbA



Células derivadas da medula óssea HbS





CPEs do sangue de Cordão

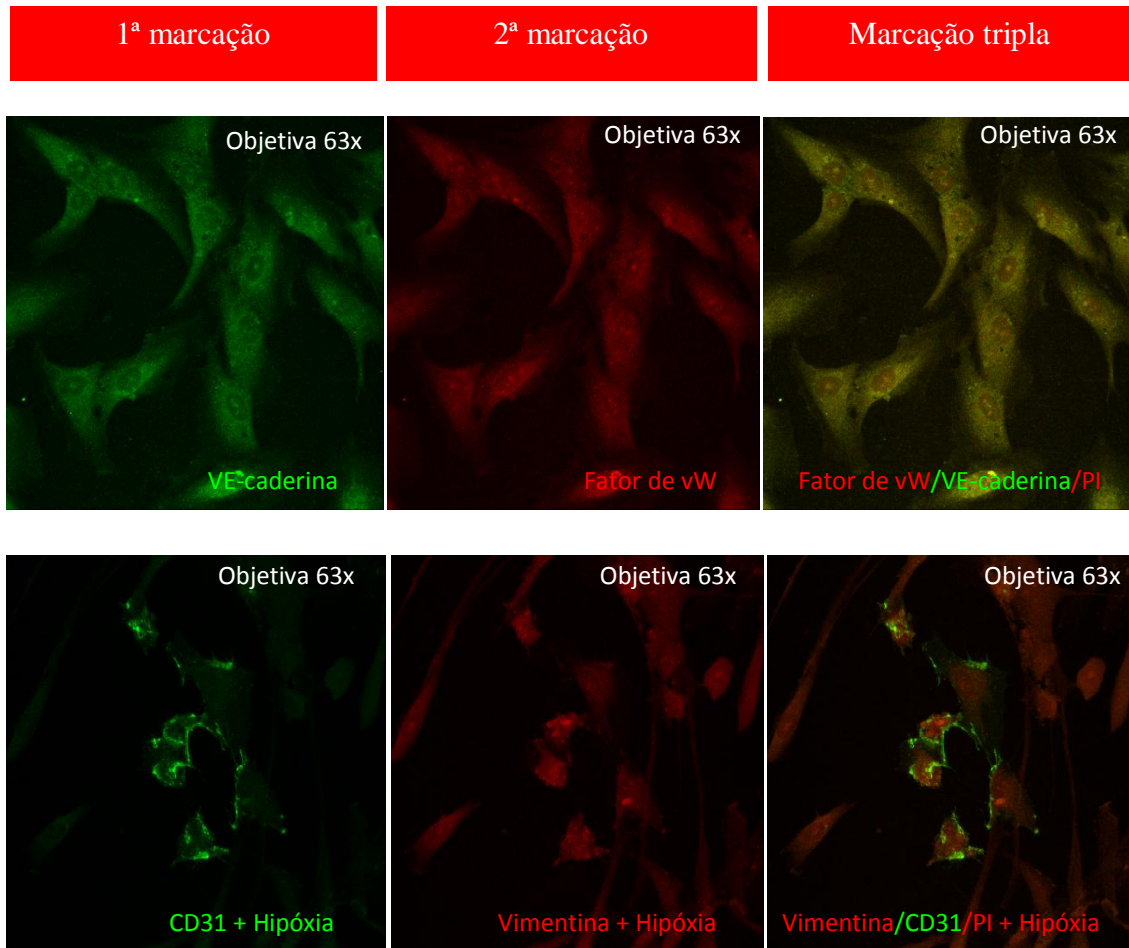
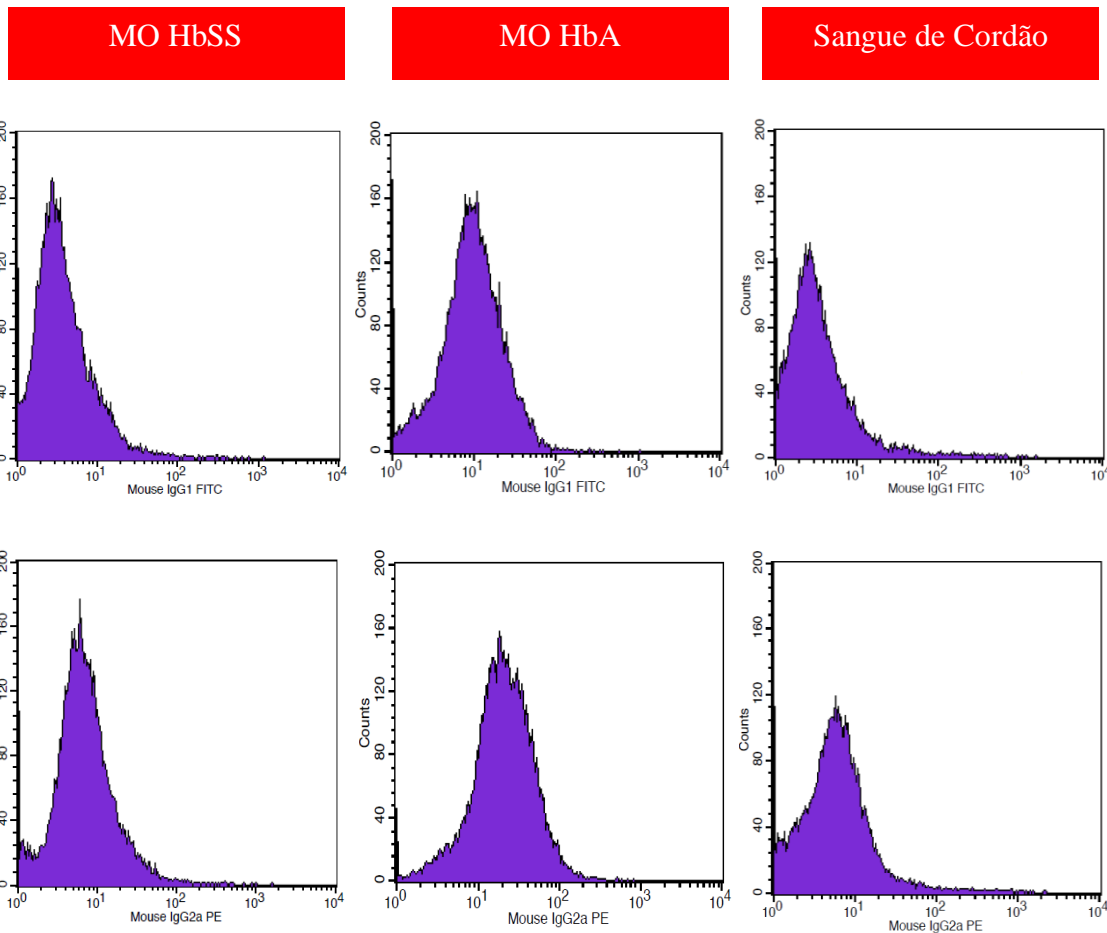


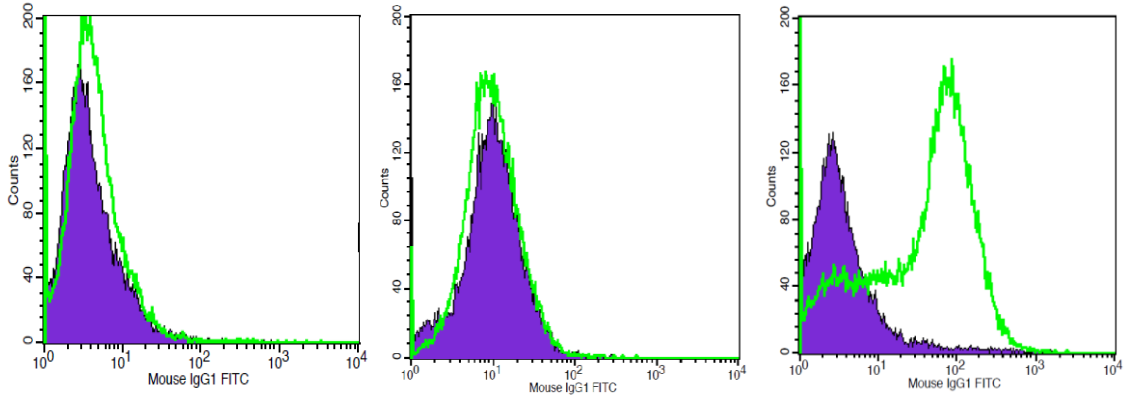
Figura 16. Marcação das células derivadas da medula óssea normal e falciforme e CPEs de cordão para VE-caderina (CD144), Fator de von Willebrand, CD31, vimentina. O núcleo das células foram corados com Iodeto de Propídio (PI). As CPEs de sangue de cordão foram submetidas a hipóxia e avaliada a expressão de CD31 e vimentina.

4.7 Caracterização Molecular de CPEs por Citometria de Fluxo

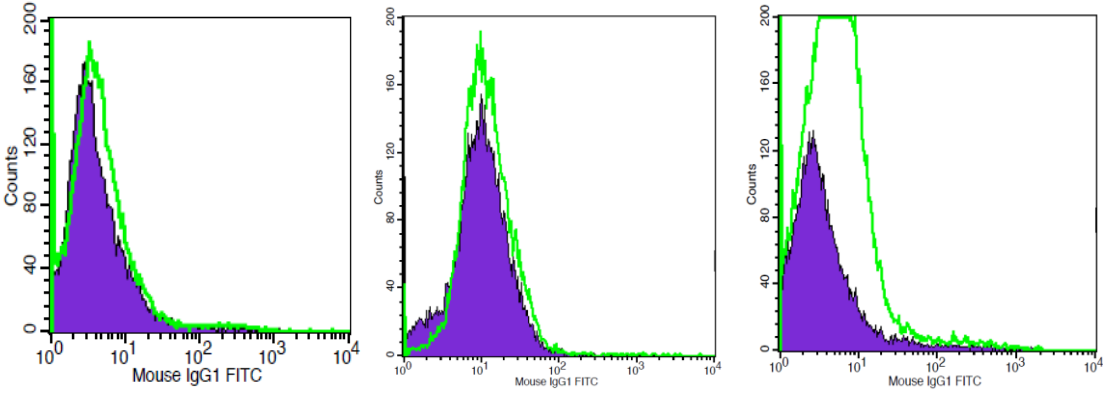
As células derivadas de medula óssea falciforme (n=9) e normal (n=9) e as CPEs de sangue de cordão umbilical (n=5) em cultura foram tripsinizadas e marcadas com os anticorpos anti-CD31, anti-KDR, anti-CD146, anti-CD105, anti-CD29, anti-CD90 e anti-CD14 e analisadas através da citometria de fluxo. Um total de 50.000 eventos foram adquiridos e o resultado representado pela figura 18 e figura 19. De acordo com os resultados foi possível observar a alta frequência de eventos positivos para CD146, CD105 e CD29, tanto nas amostras de células da medula óssea falciforme quanto nas amostras dos pacientes controles. Contudo, observou-se níveis indetectáveis de CD31, CD90 e KDR nestas amostras, quando comparadas às amostras de CPEs de sangue de cordão umbilical. Em algumas amostras também foi possível observar uma baixa expressão, porém significativa, de CD14, o que também foi coincidente com as células do sangue de cordão umbilical. Após a avaliação de todas as amostras analisadas não foram observadas diferenças significativas entre a frequência de eventos e a intensidade média relativa nas amostras de células da medula óssea normal e falciforme.



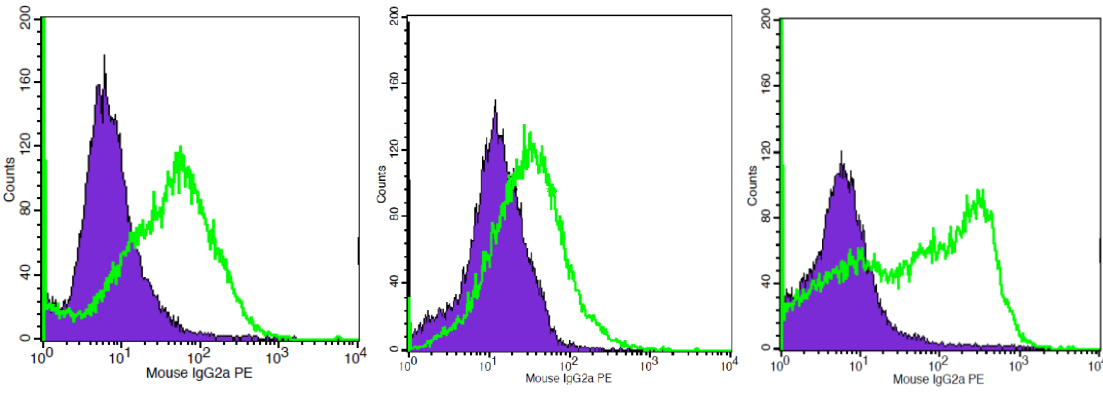
CD31



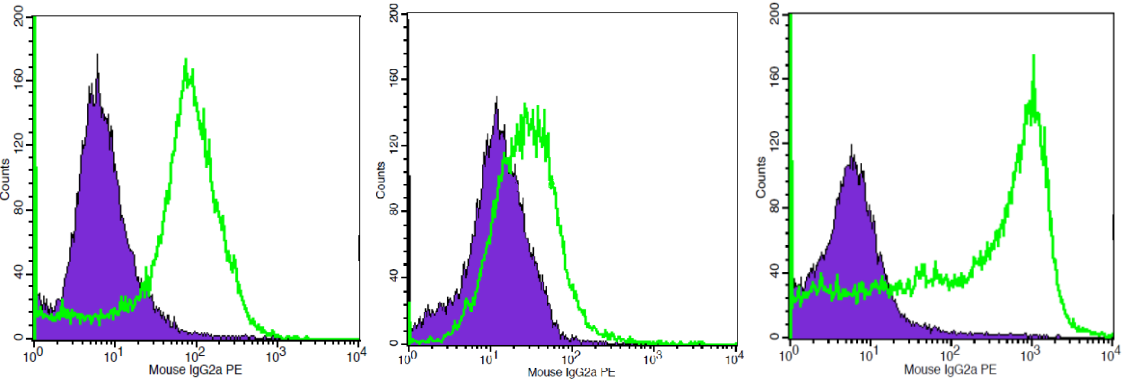
KDR



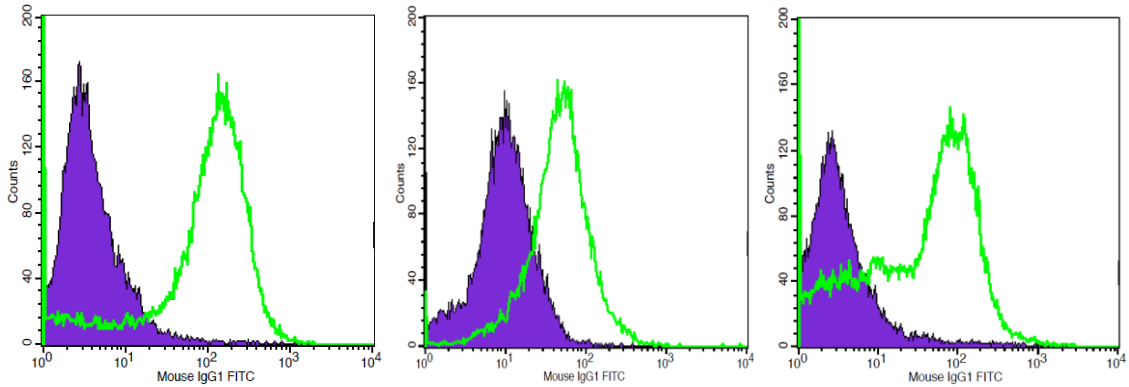
CD146



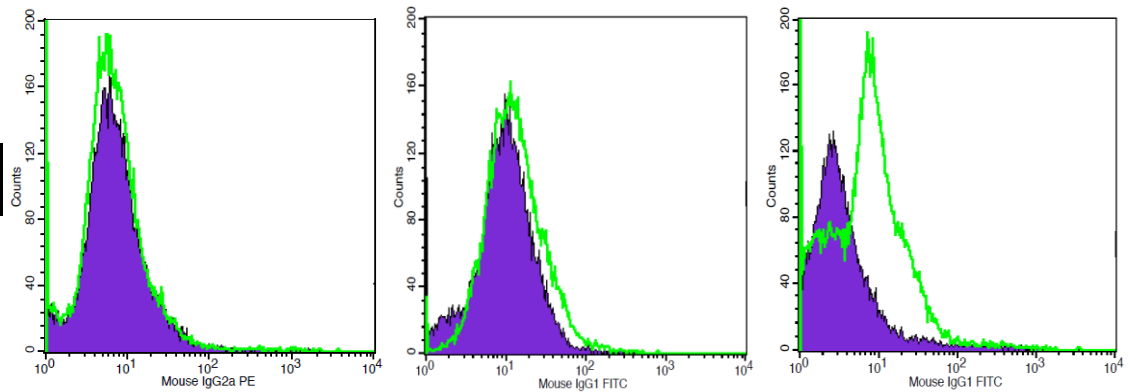
CD105



CD29



CD90



CD14

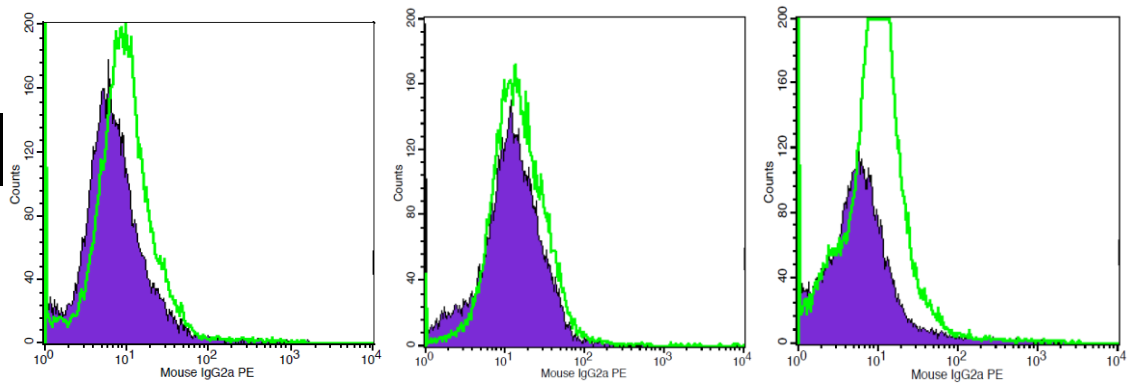


Figura 17. Avaliação da expressão de CD31 (PECAM), KDR (VEGFR2), CD146 (MCAM), CD105 (Endogлина), CD29, CD90 e CD14 nas células derivadas da medula óssea falciforme e normal comparada a expressão nas CPEs de sangue de cordão umbilical por citometria de fluxo. Gráficos representativos 9 experimentos com medulas ósseas falciformes, 9 de pacientes normais e 5 de sangues de cordão umbilicais.

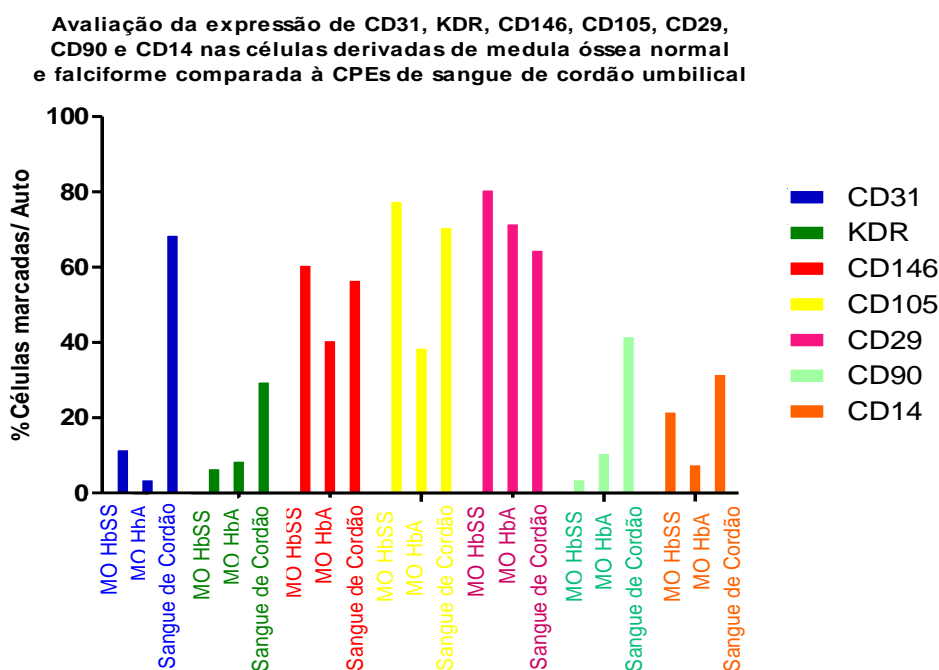


Figura 18. Expressão de CD31 (PECAM), KDR (VEGFR2), CD146 (MCAM), CD105 (Endogлина), CD29, CD90 e CD14 nas células derivadas da medula óssea falciforme e normal comparada a expressão nas CPEs de sangue de cordão umbilical pela avaliação do percentual de células marcadas com relação a autofluorescência através da análise de Kolmogorov-Smirnov (KS) (% de deslocamento).

4.8 Análise da expressão de genes marcadores de CPEs: qRT-PCR

A expressão gênica relativa das células derivadas da medula óssea normal (n=1) e falciforme (n=4) foram avaliadas através do ensaio quantitativo de qRT-PCR. Para este ensaio foram utilizados três genes endógenos, GAPDH, β -actina e RN18S1. Os resultados com os dois primeiros housekeepings foram coincidentes e o GAPDH foi escolhido para a demonstração dos resultados abaixo. A expressão relativa dos seguintes genes foi avaliada: SDF-1A, KDR (VEGFR2), THBS1, MCAM (CD146), ENDOGLINA (CD105), HIF-1A e os resultados descritos na tabela 8. Foram feitas avaliações das eficiências dos primers e apenas aqueles que alcançaram eficiência $> 1,7$ foram utilizados no estudo. Foi estabelecido um “Cut off” de 5 vezes no nível de expressão para a análise diferencial dos genes. De acordo com os resultados foi observada uma consistente super-expressão de MCAM e SDF-1 α , e redução da expressão de HIF-1 α nas amostras (Figura 20).

Nível de expressão relativa dos genes em amostras de células da medula óssea HbSS com relação ao paciente HbA				
Genes	Paciente 1	Paciente 2	Paciente 3	Paciente 4
HIF	0,7	1	0,2	0,1
KDR (VEGFR2)	0,8	0,1	22×10^9	144
ENG	1,2	0,1	1	0,2
SDF-1	5,2	666	326	1×10^{12}
THBS1	0,2	29	0,1	5,1
MCAM	4,5	16	6,1	1

Tabela 8. Nível de expressão gênica relativa dos genes HIF, KDR, ENG, SDF-1, THBS1 e MCAM em amostras dos pacientes falciformes HbSS com relação ao paciente HbA.

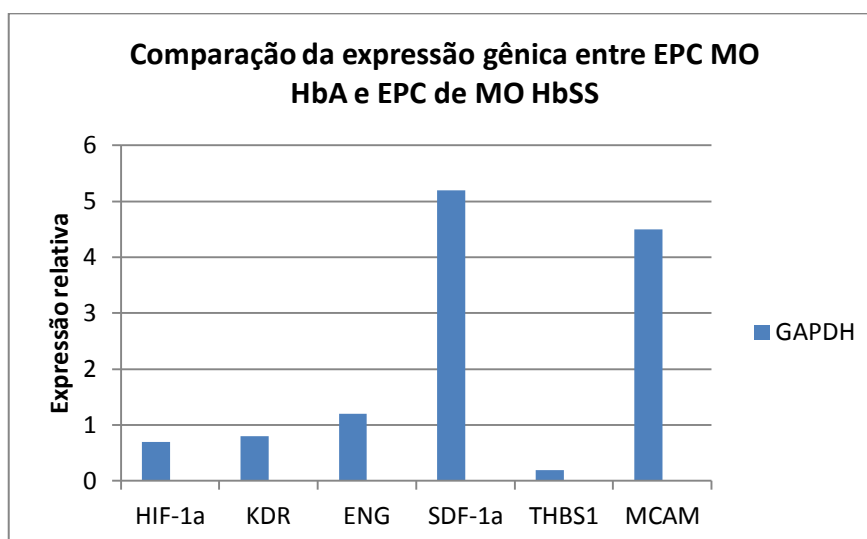


Figura 19. Amostra representativa, da comparação da expressão gênica relativa de amostra de células derivadas da medula óssea falciforme, comparada às células normais.

5. DISCUSSÃO

A anemia falciforme é uma doença caracterizada por intensas crises vaso oclusivas, hemólise, danos em múltiplos órgãos e o estresse hematopoiético. Através da análise de citometria de fluxo foi possível identificar frequências elevadas de progenitores hematopoiéticos CD34+/CD45+ no sangue periférico de pacientes falciformes. Esses dados são coincidentes com estresse hematopoiético, relatado pelo aumento do número de BFU-E e eritroblastos no sangue periférico de pacientes com anemia falciforme (WU *et al.*, 2005; CROIZAT & NAGEL, 2007). O estresse hematopoiético parece ocorrer preferencialmente em pacientes falciformes com hemólise elevada, e o mecanismo proposto envolve o aumento da produção

de fatores de crescimento de células-tronco (CSF) na medula óssea que irão estimular a produção de progenitores hematopoiéticos. Outras citocinas também podem participar sinergicamente com CSF, como IL-6, na expansão e mobilização de progenitores da medula óssea para o sangue periférico. De acordo com nossos resultados, não observamos diferenças significantes nos níveis das células $CD34^+/CD133^+/KDR^+$ e $CD34^+/KDR^+/CD45^{low/-}$ entre o sangue periférico dos pacientes falciformes quando comparados aos de indivíduos controle. Estes resultados corroboram e complementam os achados de BEEM e Col. (2009) que observaram elevação dos níveis de progenitores endoteliais circulantes apenas nos pacientes HbSC/ β -talassemia e HbSS/ β -talassemia em crise. A maior frequência dos níveis de EPC durante as crises poderia indicar o papel desta população na mobilização e re-endotelização de tecidos isquêmicos.

A população celular $CD34^+/CD133^+$ tem sido descrita na literatura como progenitores hemangioblásticos, comprometidos com linhagem sanguínea e endotelial, portanto, mais imaturos e anteriores à população de progenitores hematopoiéticos $CD34^+/CD45^+$ (GEHLING *et al.*, 2000; TIMMERMANS *et al.*, 20007). Nossos dados indicam uma redução nos níveis desta população no sangue periférico de pacientes com anemia falciforme. Embora haja uma discordância aparente nestes resultados, os dados recentes da literatura demonstram que as células $CD34^+/CD133^+/KDR^+$ representariam uma população de progenitores hematopoiéticos primitivos que expressam CD45 (CASE *et al.*, 2007). De forma similar TIMMERMAN e Col. (2007) observaram que as CPEs não são derivadas de células $CD133^+$, sugerindo que essa população representaria progenitores de origem hematopoiética com atividade pró-angiogênica parácrina. GRISAR e Col. (2005) observaram um número reduzido dessa população no sangue periférico de pacientes com Artrite Reumatóide. Em pacientes com microvasculopatia após alotransplante, foi identificado, de maneira semelhante, um número reduzido desses progenitores no sangue periférico dos pacientes (OSTO *et al.*, 2010). Nossos resultados também estão em concordância com aqueles encontrados por MOONEN e Col. (2007), em que os autores observaram uma frequência reduzida de células $CD34^+/CD133^+$ circulantes em pacientes com Lupus Eritematoso Sistêmico (LES), uma doença auto-imune em que ocorre estresse hematopoiético e tardiamente, desgaste da medula óssea. Embora o número reduzido dos níveis da população $CD34^+/CD133^+$ tenha sido descrita em doenças inflamatórias crônicas como LES e Artrite Reumatóide, nosso trabalho é o primeiro relato da frequência dessa população celular no sangue periférico em pacientes com anemia falciforme assintomáticos.

Devido aos eventos de vaso-oclusão recorrentes e recidivantes, a doença falciforme é caracterizada por micro-lesões na medula óssea que podem conduzir a necrose tecidual (KERACHIAN *et al.*, 2006). O infarto tecidual frequentemente conduz à isquemia/hipóxia tecidual, e à ativação dos mecanismos de reparo, com secreção de fatores angiogênicos e mobilização/ativação de progenitores endoteliais que estimulem a angiogênese (SEGRS & LEE, 2008). Embora, estes mecanismos fisiopatológicos estejam bem descritos para diversos tecidos periféricos, supõe-se que o mesmo ocorra no infarto da medula óssea, o que levaria a um aumento na produção de CPEs na medula óssea.

Nossos resultados de dosagem da população $CD34^+/KDR^+/CD45^{low/-}$ indicam uma alta frequência desses progenitores na medula óssea de pacientes com anemia falciforme. Na literatura essas populações celulares tem sido frequentemente correlacionadas a supostos progenitores endoteliais. Embora LUCK e Col. (2004) tenham observado níveis aumentados de células $CD34^+$ na medula óssea e sangue periférico de pacientes falciformes, o que é sugestivo de estresse hematopoiético, nenhuma inferência foi feita quanto à população de progenitores $CD34^+/CD133^+/KDR^+$ neste grupo de pacientes. Em pacientes transplantados foi encontrada a frequência reduzida dessa população celular (2 células/ 1×10^6 eventos) quando comparado com os indivíduos normais (8-10 células/ 10×10^6 eventos) (OSTO *et al.*, 2010). De forma semelhante pacientes com antrite reumatóide apresentaram níveis circulantes diminuídos desses progenitores quando comparado ao controle ($0,048 \pm 0,02\%$ vs $0,07 \pm 0,01\%$). Na medula óssea a população $CD34^+/CD133^+/KDR^+$ apresenta uma frequência baixa, menor que uma célula/ml (TURA *et al.*, 2007).

As CPEs circulantes $CD34^+/KDR^+/CD45^{low/-}$ tem sido descritas em diversas condições patológicas. Os níveis de CPEs circulantes foram monitorados em pacientes com carcinoma renal tratados com inibidores de tirosino kinases por 14 dias. Eles observaram que houve mudanças significativas dessa população após 14 dias ($0,5\%$ - $1,7\%$ do sangue total) (FERACE *et al.*, 2011). Em pacientes com disfunção ventricular essa frequência foi $0,002$ a $0,005\%$ da fração de leucócitos circulantes (BOILSON *et al.*, 2010). Estudos com pacientes com diabetes melitus tipo 2 a frequência dessa população foi significativamente menor que nos controles (1053 ± 101 células/ml vs 1649 ± 105 células/ml) (LIAO *et al.*, 2010). Coincidentemente em pacientes com osteonecrose foi identificado níveis reduzido das CPEs $CD34^+/KDR^+/CD45^{low/-}$ circulantes quando comparado aos controles (545 ± 177 células/ml vs 1460 ± 265 células/ml). De acordo com esses resultados o número reduzido de CPEs circulantes nestes pacientes estaria relacionado com fator risco elevado para o

desenvolvimento da necrose óssea (FENG *et al.*, 2010). Contudo nossos resultados complementam esses achados sugerindo que embora não exista diferenças significantes nos níveis circulantes desses progenitores, os níveis medulares estão elevados, possivelmente devido ao estresse endotelial. Em pacientes falciformes HbSC/ β -talassemia e HbSS/ β -talassemia assintomáticos BEEM e Col. (2009) não identificaram essa população celular (0 - 0 células/ml), no entanto em pacientes em crise vaso-oclusiva a frequência das CPEs circulantes aumentaram significativamente (0 - 186 células/ml). Na medula óssea tem sido identificado diferentes populações celulares com potencial angiogênico. Contudo TIMMERMANS e Col. (2007) através de seleção magnética utilizando “microbeads” de CD34 observaram que apenas as células CD34⁺/CD45^{low/-} foram capazes de formar colônias de células endoteliais. Esses progenitores foram capazes de formar cerca de 8 colônias/8x10³ células em média, enquanto as células CD133⁺ e CD34⁺/CD45^{low} faltaram essa característica.

Trabalhos recentes sugerem que a população celular com fenótipo CD34⁺/CD45^{low/-} contenha maior frequência de células progenitoras endoteliais (CASE *et al.*, 2007, TIMMERMANS *et al.*, 2007). Nossos resultados são concordantes com estes achados, pois se baseiam em análise da população CD34⁺/KDR⁺/CD45^{low/-} que está contida no fenótipo mais abrangente CD34⁺/CD45^{low/-}. No entanto, a descrição e o papel de uma célula progenitora endotelial não deve fundamentar-se apenas na análise de marcadores fenotípicos, mas também deve contemplar a caracterização biológica (celular, molecular e funcional) desta população. Essas células precisam ser avaliadas quanto à sua capacidade de formar colônias *in vitro*, possuir marcadores de células endoteliais e serem capazes de promover a vasculogênese *in vivo* (SIEVEKING *et al.*, 2008).

A anemia falciforme é uma doença que apresenta um estado inflamatório crônico (MAKIS *et al.*, 2000). Embora os valores medianos de TGF- β e VEGF estejam mais reduzidos que os valores dos controles, é possível observar que um número maior de pacientes apresentaram níveis elevados dessas citocinas. Esses resultados são concordantes com os dados obtidos por CROIZAT & NAGEL (1999).

Os níveis de VEGF foram encontrados elevados nos pacientes falciformes neste trabalho e esses resultados corroboram com dados encontrados por BEEM e Col. (2009). Eles detectaram níveis aumentados de VEGF em pacientes falciformes que aumentaram em pacientes em crise. O VEGF é uma importante citocina angiogênica que está relacionada com a produção, mobilização, proliferação e diferenciação de CPEs. Em nosso trabalho, os níveis

aumentados dessa citocina estariam relacionados com o aumento desses progenitores (células CD34⁺/CD133⁺/KDR⁺ e CD34⁺/KDR⁺/CD45^{low/-}) na medula óssea dos pacientes falciformes. As sucessivas crises vaso-oclusivas, danos endoteliais e necrose medular podem estimular a neovascularização conduzindo ao estado pró-angiogênico desses pacientes e consequentemente ao aumento de CPEs. Embora os níveis de VEGF tenham sido encontrados elevados neste trabalho, níveis plasmáticos de SDF-1 α não apresentaram diferenças entre pacientes falciformes e os indivíduos controle. Esses resultados contrastam com dados encontrados por LANDBURG e Col. (2009) que identificaram níveis circulantes elevados de SDF-1 α em pacientes HbS/ β -talassemia do indivíduos controles. JIN e Col. (2007) propuseram que o SDF-1 α tem um papel essencial na retenção e mobilização de progenitores da medula óssea para o sangue periférico (JIN *et al.*, 2007). Para que ocorra a migração celular, deve haver uma diferença no gradiente de concentração, para que as células progenitoras possam migrar em direção ao gradiente de SDF-1 (JIN *et al.*, 2007). Assim, possivelmente, os níveis elevados de CPEs encontrados na medula óssea falciforme podem está relacionado aos baixos níveis plasmáticos de SDF-1 α , o que favoreceria a retenção desses progenitores na medula óssea.

Nosso estudo também não observou diferenças significativas nos níveis de TNF entre pacientes falciformes e controle. Contrariamente aos nossos resultados LANARO e Col. (2009) observaram níveis entre 3,0 pg/ml de TNF em pacientes com anemia falciforme em estado estável, enquanto que os controles apresentaram níveis entre 1,5 pg/ml dessa citocina, sugerindo um estado pró-angiogênico dos pacientes. No entanto CAJADO e Col. (2011) reportou níveis entre 29,711 \pm 19,49 pg/ml dessa citocina em crianças com anemia falciforme estáveis no estado da Bahia. Em nosso trabalho não observamos diferenças significativas entre os níveis plasmáticos de TNF nos pacientes falciformes e controles que apresentaram valores entre 80pg/ml dessa citocina. As diferenças dos níveis dessa citocina podem estar relacionadas com a variabilidade dos kits de análise utilizados neste trabalho. Contudo, esses dados estão coerentes com os níveis aumentados de TGF- β . O TGF- β é uma citocina imunoregulatória e pode agir reduzindo a resposta inflamatória modulando os níveis de TNF. O TNF é uma importante citocina pró-inflamatória que age aumentando a resposta inflamatória, induzindo a cascata de coagulação, estimulando a produção de proteínas de fase aguda e levando a ativação endotelial.

Para completar a descrição da população de CPEs, as células da medula óssea foram isoladas de acordo com protocolo estabelecido por INGRAM e Col. (2004). Optou-se por utilizar as

CPEs do sangue cordão umbilical como controle positivo dos experimentos, pois esta foi a primeira fonte descrita enriquecida em CPEs. Nossos resultados descrevem que as CPEs isoladas apresentaram morfologia fibroblastóide, típica de células mesenquimais, quando comparadas ao controle positivo que apresentou morfologia cubóide, típica de células pré- endoteliais. A capacidade funcional das células foi avaliada através dos ensaios de curva de proliferação, invasão celular e tubulogênese. Os resultados revelaram que as CPEs da medula óssea são células proliferativas, capazes de secretar proteases e atravessar componentes da matriz extracelular e se organizar sobre matriz formando estruturas semelhantes a túbulos *in vitro*, contudo morfologicamente diferentes das estruturas formadas CPEs controle. Estudos da função das CPEs em diversas doenças crônicas como LES, Síndrome Metabólica e Diabetes tem revelado uma função migratória prejudicada e de formação de túbulos dessas células (MOONEN *et al.*, 2007; JIALAL *et al.*, 2010; TAN *et al.*, 2010). Em condições fisiológicas as CPEs devem interagir com componentes da matriz extracelular e aumentar a expressão local de proteases que degradam a membrana basal, permitindo a migração das células, integração vascular e o brotamento do vaso. Teoricamente, após a migração para os locais de angiogênese ativa, as CPEs proliferariam e se diferenciariam em células endoteliais, formando redes vasculares. Posteriormente a rede vascular nascente seria estabilizada pelos pericitos (FRANCIS *et al.*, 2008; SILVA *et al.*, 2008). Na anemia falciforme não existe relato na literatura acerca da capacidade funcional das CPEs de medula óssea. Os resultados do presente trabalho sugerem que as CPEs isoladas da medula óssea falciforme são células viáveis, capazes de responder aos estímulos angiogênicos, sendo possivelmente uma importante ferramenta para a terapia celular nessa população de pacientes.

Os resultados de imunofluorescência revelaram que essas células apresentaram uma marcação difusa de CD31, VE-caderina e fvW, que são proteínas marcadoras de células endoteliais, as quais foram confirmadas através da análise da microscopia confocal. Essas células expressaram UEA-1, de forma semelhante ao controle positivo. Essas células também marcaram para vimentina, uma proteína do citoequeleto, frequentemente expressa em células mesenquimais aderentes da medula óssea. A escassez de trabalhos na literatura acerca do perfil imunofenotípico das CPEs de medula óssea humana dificulta a análise comparativa desses dados. Contudo, OSWALD e Col. (2004) observaram que as CTMs cultivadas em condições semelhantes às nossas, ou seja, na presença de VEGF apresentaram uma intensidade fluorescência aumentada para fvW, quando comparada às CTM indiferenciadas. O CD31 é uma proteína que é expressa na membrana das células, em locais de adesão focal e

fibras de estresse (SENEGAGLIA, 2007; WATT *et al.*, 2010). As marcações atípicamente positivas encontradas nesse trabalho sugere que diferentes fatores podem estar relacionados com esses achados. A origem estromal das células, sugerida pela expressão de vimentina e os padrões de marcações indicam tanto o isolamento de progenitores endoteliais imaturos em fase de transição mesênquima/endotélio ou a contaminação da cultura com CTMs clássicas.

As análises de citometria revelaram que as CPEs da medula óssea apresentaram níveis indetectáveis das proteínas endoteliais CD31, KDR e CD90, marcador de células progenitoras. Entretanto apresentaram eventos positivos para CD146, CD105 e CD29, marcadores de células subendoteliais e mesenquimais (BARBARA *et al.*, 1998; GUEZGUEZ *et al.*, 2007; TRIPODO *et al.*, 2009; PRUSZAK *et al.*, 2009). DEL PAPA e Col. (2006) observaram que células CD133+ derivadas da medula óssea, de morfologia fibroblastóide, na presença de VEGF, são capazes de converter para o fenótipo endotelial como demonstrado pela expressão de CD146, CD31, VE-caderina e fvW. Coincidentemente OSWALD e Col. (2004) demonstraram através da análise de citometria, que CTM derivadas de medula óssea na presença de VEGF aumentaram a expressão de marcadores de células endoteliais KDR, VE-caderina, V-CAM-1 e fvW, e foram capazes de formar estruturas semelhante a túbulos *in vitro*. Acreditamos que a ausência de expressão para o marcador CD31 na citometria possa ter sido comprometida pela técnica. Assim como a VE-Caderina, o CD31 é uma molécula membranar que é sensível ao tratamento enzimático utilizado para descolar as células do suporte plástico de cultivo, antes de proceder à marcação para citometria. Além disto, o uso de diferentes anticorpos em cada uma das metodologias pode explicar os dados conflitantes entre os resultados de citometria e imunofluorescência, para CD31. KDR é o receptor de VEGF que é expresso em diversas células como monócitos, macrófagos, megacarócitos e células endoteliais. Estudos da literatura revelam que células endoteliais cultivadas na presença de VEGF têm o seu receptor endocitado, embora continue sinalizando a produção da citocina internamente, o que explicaria, em parte a ausência da proteína na superfície celular (WANG *et al.*, 2002). CD90 é uma proteína expressa em diversas células progenitoras como CTM, CTH e CPEs (HEGE & HAGOOD, 2006). Contudo, neste trabalho, as CPEs isoladas não apresentaram níveis detectáveis dessa proteína. A variabilidade da expressão desse marcador de acordo com a idade é uma possível explicação desse resultado. A expressão dos marcadores de células subendoteliais e mesenquimais são concordantes com resultados anteriores, reforçando a hipótese de isolamento de progenitores endoteliais imaturos da medula óssea.

Após a investigação dos marcadores de superfície celular foi realizada uma análise de expressão gênica para avaliar a presença de transcritos gênicos de KDR, SDF, MCAM (CD146), CD105 (Endogлина), e HIF-1. Foi utilizado nesta análise apenas uma amostra de paciente HbA como controle de expressão gênica. Encontramos uma expressão aumentada de SDF-1, MCAM e diminuída de HIF-1. SDF-1A ou CXCL12, que tem como receptor CXCR4 é uma quimiocina envolvida na mobilização, incorporação, “homing”, sobrevivência, proliferação e diferenciação de células-tronco (JIN *et al.*, 2008; CHAN *et al.*, 2009). CD146 (MCAM) é um membro da superfamília das imunoglobulinas que age como molécula de adesão. Ela é expressa em células mesenquimais, pericitos, células endoteliais e linfócitos T (GUEZGUEZ *et al.*, 2007; TRIPODO *et al.*, 2009). Em nossas amostras identificamos uma elevada expressão desses genes quando comparado ao controle HbA (expressão relativa 5X que no controle). A análise de expressão gênica é concordante com resultados obtidos da citometria de fluxo e juntos esses dados fornece evidências adicionais para o fenótipo de transição das células de medula óssea estudadas neste trabalho. O HIF-1A é um fator transcricional ativado na hipóxia e que induz a síntese de VEGF e mobilização de CPEs da medula óssea para os locais de lesão (URBICH & DIMMELER, 2004; TOUSOULIS *et al.*, 2008; JIN *et al.*, 2008; YU *et al.*, 2009; TONGERS *et al.*, 2010). O gene do HIF é ativado em condições de baixas tensões de oxigênio. Na medula óssea os níveis encontrados de O₂ é de 5-7%. As condições de cultivo (hiperóxia) em atmosfera regular (20% de O₂) não favorecem a expressão do HIF, o que explica a baixa expressão desse gene nas amostras de medula óssea falciforme cultivadas expandidas em condições atmosfera.

Em resumo, os ensaios de caracterização celular e identidade molecular apontam para o isolamento de progenitores endoteliais progenitores imaturos em fase de transição mesenquimal/endotelial ou uma população heterogêneas, contendo células tronco mesenquimais e células progenitoras endoteliais. De modo geral as CPEs isoladas da medula óssea falciforme, parecem representar uma importante fonte para a terapia celular e medicina regenerativa vascular para os pacientes falciformes. Porém, devido as limitações das amostras disponíveis e ao baixo desempenho inerentes dos ensaios biológicos para as CPEs há uma necessidade urgente de chegar a uma padronização aceitável para a avaliação das CPEs.

6. CONCLUSÕES

- A medula óssea falciforme apresentou uma alta frequência de células progenitoras CD34+/CD133+/KDR e CD34+/KDR+/CD45low/- e que pode estar relacionado ao estresse angiogênico nesses pacientes;
- As células isoladas da medula óssea apresentaram a proteína UEA-1, CD105, CD146, CD29 e colocalizaram as proteínas CD31, CD144 (VE-caderina), vimentina e fvW de forma atípica na célula, sugerindo o isolamento de progenitores endoteliais imaturos. A análise de expressão gênica revelou a alta expressão de SDF-1 α e MCAM (CD146) nas amostras e redução da expressão de HIF-1 α . As CPEs foram apresentaram *in vitro* morfologia fibroblastóide típica de células do estroma da medula óssea. As CPEs demonstraram capacidade proliferativa, migratória e de diferenciação *in vitro* em estruturas semelhante a túbulos em resposta a fatores de crescimento;
- Os níveis plasmáticos de TNF e SDF não apresentaram diferenças significantes, contudo os níveis de TGF- β e VEGF foram encontrados aumentados nos pacientes falciformes quando comparados ao controle.

7. PERSPECTIVAS

Diante da limitação das amostras controle e dos ensaios biológicos *in vitro* utilizados neste trabalho faz-se necessário uma ampliação do número de amostras e introdução de ensaios funcionais mais acurados. Para a avaliação mais precisa do potencial angiogênico das CPEs da medula óssea falciforme os ensaios *in vitro* precisam obedecer um rigor maior de qualidade com a utilização de ensaios tridimensionais, que corresponderiam mais fidedignamente ao contexto *in vivo*. Além disso, ensaios *in vivo* de neoangiogênese são de fundamental importância para comprovar o potencial terapêutico dessas células.

AGRADECIMENTOS

Ao Laboratório de Imunologia (LABIMUNO) do Instituto de Ciências da Saúde (ICS) e ao Laboratório de Bioengenharia Tecidual e Biomateriais da Universidade Federal da Bahia (UFBA) e, ao Serviço de Hemetologia e Ortopedia e Traumatologia do Complexo Hospitalar Universitário Professor Edgar Santos da UFBA.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADORNO, Elisângela Vitória; COUTO, Fábio David; NETO, José Pereira de Moura; MENEZES, Joelma Figueiredo; RÊGO, Marco; REIS, Mitermayer Galvão; GONÇALVES, Marilda Souza. Hemoglobinopathies in newborns from Salvador, Bahia, Northeast Brazil. **Cad. Saúde Pública**, 21 (1): 292-298, 2005.

ABHISHEK, Kumar; KUMAR, Ritesh, ARIF, Ehtesham; PATRA, P. K.; CHOUDHARY, S. B.; SOHAIL, Mohammad. Induced expression of bone morphogenetic protein-6 and Smads signaling in human monocytes derived of dendritic cells during sickle-cell pathology with orthopedic complications. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 396: 950-955, 2010.

AHN, G. O.; BROWN, J. M. Role of endothelial progenitor and other bone-marrow derived cells in the development of the tumor vasculature. **Angiogenesis**, 12(2): 159-164, 2009.

AKINSHEYE, I.; ALSULTAN, A.; SOLOVIEFF, N.; NGO, D.; BALDWIN, C. T.; SEBASTIANI, P.; CHUI, D. H.; STEINBERG, M. H. Fetal hemoglobin in sickle cell anemia. **Blood**, 118(1): 19-27, 2011.

AKINYoola, A. L.; ADEDIRAN, I. A.; ASALEYE, C. M.; BOLARINWA, A. R. Risk factors for osteonecrosis of the femoral head in patients with sickle cell disease. **International Orthopaedics**, 33: 923-926, 2009.

ALMEIDA, A.; ROBERTS, I. Bone Involvement in sickle cell disease. **Br. J. Haematol.**, 129(4): 482-90, 2005.

AU, Patrick; TAM, Joshua; FUKUMURA, Dai; JAIN, Rakeshe K. Bone marrow derived mesenchymal stem cells facilitate engineering of long-lasting functional vasculature. **Blood**, 2007.

ASAHARA, Takayuki; MUROKARA, Toyoaki; SULLIVAN, Alison; SILVER, Marcy; ZEE, Rie Van Der; LI, Tong; WITZENBICHLER, Bernhard; SCHATTEMAN, Gina; ISNER, Jeffrey M. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. **Science**, 275: 964-967, 1997.

AUTIERO, Monica, SMET, Frederik De; CLAES, Filip, Carmeliet, Peter. Role of neural guidance signal in blood vessel navigation. **Cardiovascular Research**, 65: 629-638, 2005.

BALDWIN, Clinton; NOLAN, Viki G.; WYSZYNSKI, Diego F.; MA, Qian-Li, SEBASTIANI, Paola; EMBURY, STEPHEN H.; BISBEE, Alice; FARREL, John; FARRER, Lindsay; STEINBERG, Martin H. Association of klotho, bone morphogenetic protein-6 and annexin A2 polymorphisms with sickle cell osteonecrosis. **Blood**, 106: 272-275, 2005.

BARBARA, N. P.; WRANA, J. L.; LETARTE, M. Endoglin is an accessory protein that interact with the signaling receptor complex of multiple members of the transforming growth factor- β superfamily. **The Journal of Biological Chemistry**, 274(2): 584-594, 1999.

BEEM, Rachel T. Van; NUR, Erfan; ZWAGINGA, Jaap Jan; LANDBURG, Precious P.; BEER, Eduard J. Van; DUITZ, Ashley; BRANDJES, Dees P.; LOMMERSE, Ingrid; BOER, Hetty C. De; SCHOOT, Ellen Van Der; SCHNOG, John-John B.; BIEMOND, Bart J. Elevated endothelial progenitor cells during painful sickle cell crisis. **Experimental Hematology**, 37:1054–1059, 2009.

BEJAR, Jacob; PELED, Eli; BOSS, Jachanan H. Vasculature deprivation-induced osteonecrosis of the rat femoral head as a model for therapeutic trials. **Theoretical Biology and Medical Modelling**, 2: 24, 1-14, 2005.

BERTRAND, Julien Y.; CHI, Neil C.; SANTOSO, Buyung; TENG, Shutian; STANIER, Didier Y.; TRAVER, David. Haematopoietic stem cells derive directly from aortic endothelium during development. **Nature**, 464 (4): 2010.

BEYTH, Shaul; SCHROEDER, Josh; LIBERGALL, Meir. Stem cells in bone diseases: current clinical practice. **British Medical Bulletin** 99: 199–210, 2011.

BIANCO, Paolo. Bone and Hematopoietic niche: a tale of two stem cells. **Blood**, 117: 5281-5288, 2011.

BIANCO, Paolo; ROBEY, Pamela Gehron; SAGGIO, Isabella; RIMINUCCI, Mara. “Mesenchymal” stem cells in human bone marrow (Skeletal stem cells): A critical discussion of their nature, identity, and significance in incurable skeletal disease. **Human Gene Therapy**, 21: 1057-1066, 2010.

BLANN, A. D.; WOYWODT, A.; BERTOLINI, F.; BULL, T. M.; BUYON, J. P.; CLANCY, R. M.; HAUBITZ, M.; HEBBEL, R. P.; LIP, G. Y. H.; MANCUSO, P.; SAMPOL, J.;

SOLOVEY, A. Circulating endothelial cells: Biomarker of vascular disease. **Thrombosis Haemostasis**, 93: 228-35, 2005.

BOILSON, B. A.; LARSEN, K.; HARBUZARIU, A.; DELACROIX, S.; KORINEK, J.; FROEHLICH, H.; BAILEY, K. R.; SCOTT, C. G.; SHAPIRO, B. P.; BOERRIGTER, G.; CHEN, H. H.; REDFIELD, M. M.; BURNETT, J. C.; SIMARI, R. D. Regulation of circulating progenitor cells in left ventricular dysfunction. **Circ. Heart Fail**, 3: 635-642, 2010.

BRASIL, Anvisa. Manual de Diagnóstico e Tratamento de Doenças Falciformes. 2002.

CAJADO, C.; CERQUEIRA, B. A. V.; COUTO, F. D.; MOURA-NETO, J. P.; VILAS-BOAS, W.; DOREA, M. J.; LYRA, I. M.; BARBOSA, C. G.; REIS, M. G.; GONÇALVES, M. S. TNF-alpha and IL-8: Serum levels and gene polymorphisms (_308G>A and _251A>T) are associated with classical biomarkers and medical history in children with sickle cell anemia. **Cytokine**, 2011.

CALZI, S. L.; NEU, M. B.; SHAW, L. C.; KIELCZEWSKI, J. L.; MOLDOVAN, N. I.; GRANT, M. B. EPCs and pathological angiogenesis: When good cells go bad. **Microvascular Research**, 2010.

CAPLAN, Arnold I. New Era of Cell-Based Orthopedics Therapy. **Tissue Engineering Part B**, 15(2): 195-200, 2009.

CASE, Jamie; MEAD, Laura E.; BESSLER, Waylan K.; PRATER, Daniel; WHITE, Hilary A.; SAADATZADEH, M. R.; BHAVSAR, Janak R.; YODER, Mervin C.; HANELINE, Laura S.; INGRAM, David A. Human CD34⁺AC133⁺VEGFR2⁺ cells are not cells endothelial progenitor cells but distinct, primitive hematopoietic progenitors. **Experimetal Hematology**, 35: 1109-1118, 2007.

CHEN, Jun Zhu; ZHANG, Fu Rong; TAO, Qian Min; WANG, Xing Xiang; ZHU, Jian Hua; ZHU, Jun Hui. Number and activity of endothelial progenitor cells from peripheral blood in patients with hypercholesterolaemia. **Clinical Science**, 107: 273-280, 2004.

COSSU, Giulio; BIANCO, Paolo. Mesoangioblasts – vascular progenitor for extravascular mesodermal tissues. **Current Opinion in Genetics and Development**, 13: 537-542, 2003.

CRITSER, Paul J.; YODER, Mervin C. Endothelial colony-forming cell role neoangiogenesis and tissue repair. **Curr. Opin. Organ Transplant**, 15: 68-72, 2010.

CAÇADO, Rodolfo Delfini. Doenças Falciformes. **Prática Hospitalar**, 50: 61-64, 2007.

CARMELIET, P. ; Angiogenesis in health and disease. **Nature Medicine**, 9: 653-660, 2003.

CARMELIET, P. Angiogenesis in life, disease and medicine. **Nature**, 438(7070): 932-36, 2005.

CHAO, Hsu; HIRSHI, Karen K. Hemato-vascular origins of endothelial progenitor cells?. **Microvascular Research**, 2010.

CHANG, L. T.; YUEN, C. M.; SUN, C. K.; WU, C. J.; SHEU, J. J.; CHUA, S.; YEH, K. H.; YANG, C. H.; YOUSSEF, A. A.; YIP, H. K. Role os stromal cell-derived factor-1 α and value of circulating interleukin-10 and andothelial progenitor cells in patients with acute myocardial infarction undergoing primary coronary angioplasty. **Circulation Journal**, 73: 1097-1104, 2009.

CROIZAT, Helena; NAGEL, Ronald L. Circulating cytokines response and the levels of erythropoiesis in sickle cell anemia. **American Journal of Hematology**, 60:105-115, 1999.

DALTRO, Gildásio Cerqueira; FORTUNA, Vitor Antonio; ARAÚJO, Marco Aurélio Salvino; LESSA, Paulo Itamar Ferraz; SOBRINHO, Uirassú de Assis; BOROJEVIC, Radovan. Femoral Head necrosis treatment with autologous stem cell in sickle cell disease. **Acta Ortop. Bras.**, 16 (1): 23-27, 2008.

DISTLER, J. H. W.; BEYER, C.; SCHEET, G.; LÜSCHER, T. F.; GAY, S.; DISTLER, O. Endothelial progenitor cells: Novel players in the pathogenesis of rheumatic diseases. **Arthritis & Rheumatism**, 60(11): 3168-3179, 2009.

DOHMANN, Hans Fernando R. ; PERIN, Emerson C. ; BOROJEVIC, Radovan; SILVA, Suzana A. ; SOUZA, Andre L. S. ; SILVA, Guilherme V. ; ASSAD, João A. R. ; ROSSI, Maria I. D. ; MESQUITA, Claudio T. ; DOHMANN, Hans J. Melhora Sintomática e da Capacidade de Exercício Após o Transplante Autólogo, Transendocárdico, de Células Mononucleares da Medula Óssea em Pacientes com Cardiopatia Isquêmica Grave, Sustentada até o Sexto Mês de Evolução. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, 84 (5): 360-366, 2005.

DOME, B.; DOBOS, J.; TOVARI, J.; PAKU, S.; KOVACS, G.; OSTOROS, G.; TIMAR, J. Circulating bone marrow-derived endothelial progenitor cells: Characterization, mobilization, and therapeutic considerations in malignant disease. **Cytometry part A**, 76A: 186-193, 2008.

DOME, B.; TIMAR, J.; DOBOS, J.; MESZAROS, L.; RASO, E.; PAKU, S.; KENESSEY, I.; OSTOROS, G.; MAGYAR, M.; LADANYI, A.; BOGOS, K.; TOVARI, J. Identification and clinical significance of circulating endothelial progenitor cells in human non-small cell lung cancer. **Cancer Research**, 66(14): 7341-7, 2006.

DUIITS, Ashley J.; RODRIGUEZ, Tati; SCHNOG, John-John B. Serum levels of angiogenic factors indicate a pro-angiogenic state in adults with sickle cell disease. **Br. J. Haematol.**, 134: 116-119, 2006.

EBNER, B.; PICARD, F.; RICHTER, J.; DARRELMANN, E.; SCHNEIDER, M.; STRAUER, B. E.; BREHM, M. Accumulation of VEGFR2⁺/CD133⁺ cells and decreased number and impaired functionality of CD34⁺/VEGFR2⁺ cells in patients with SLE. **Rheumatology**, 49: 63-72, 2010.

EGAN, C. G.; CAPORALI, F.; GARCIA-GONZALEZ, E.; GALEAZZI, M.; SORRENTINO, M. Endothelial progenitor cells and colony forming unit in rheumatoid arthritis: association with clinical characteristics. **Rheumatology**, 47: 1484-1488, 2008.

FADINI, Gian Paolo; BAESSO, ILENIA; ALBIERO, Mattia; SARTORE, Saverio; AGOSTINI, Carlo; AVOGARO, Angelo. Technical notes endothelial progenitor cells: Ways to escape from the knowledge plateau. **Atherosclerosis**, 197: 496-503, 2008.

FARACE, F.; GROSS-GOLPIL, M.; TOURNAY, E.; TAYLOR, M.; VIMOND, N.; JACQUES, N.; BILLIOT, F.; MAUGUEN, A.; HILL, C.; ESCUDIER, B. Levels of circulating CD45^{dim}CD34⁺VEGFR2⁺ progenitor cells correlate with outcome in metastatic renal cells carcinoma patient treated with tyrosine kinase inhibitors. **British Journal of Cancer**, 14: 1144-1150, 2011.

FENG, Yong; YANG, Shu-Hua; XIAO, Bao-Jun; XU, Wei-Hua; YE, Shu-Nan; XIA, Tian; ZHENG, Dong; LIU, Xian-Zhe; LIAO, Yun-Fei. Decreased in the number and function of circulation endothelial progenitor cells in patients with avascular necrosis of the femoral head. **Bone**, 46: 32-40, 2010.

FERRARI, Nadir; AZEVEDO, Eliane S. Relatos Sobre a História da Genética na Bahia. **Gazeta Médica da Bahia**, 2: 237-240, 2007.

FLOUZAT-LACHANIETE, Charles Henri; ROUSSIGNOL, Xavier; POIGNARD, Alexandre; MUKISI-MUKASA, Martin; MANICOM, Olivier; HERNIGOU, Philippe. Multifocal joint osteonecrosis in sickle cell disease. **The Open Orthopaedics Journal**, 3: 32-35, 2009.

FRANCIS, Megan E.; URIEL, Shiri; BREY, Eric M. Endothelial Cell-Matrix Interactions in Neovascularization. **Tissue Engineering: Part B**, 14(1): 19-31, 2008.

FRENETTE, Paul S.; ATWEH, George F. Sickle cell disease: Old discoveries, new concepts, and future promise. **The Journal of Clinical Investigation**, 117(4): 850-858, 2007.

GANGJI, Valérie; HAUZEUR, Jean-Philippe. Treating osteonecrosis with autologous bone marrow cells. **Skeletal Radiol.**, 39: 209-211, 2010.

GEHLING, U. M.; ÈRGUN, S.; SCHUMACHER, U.; WAGENER, C.; PANTEL, K.; OTTE, M.; SCHUCH, G.; SCHAFHAUSEN, P.; MENDE, T.; KILIC, N.; KLUGE, K.; SCHÄFER, B.; HOSSFELD, D. K.; FIEDLER, W. In vitro differentiation of endothelial cells from AC133-positive progenitor cells. **Blood**, 95(10): 3106-12, 2000.

GONÇALVES, M. S.; BOMFIM, G. C.; MACIEL, E.; CERQUEIRA, I.; LYRA, I.; ZANETTE, A.; BOMFIM, G.; ADORNO, E. V.; ALBUQUERQUE, A. L.; PONTES, A.; DUPUIT, M. F.; FERNANDES, G. B.; DOS REIS, M. G. BetaS-haplotypes in sickle cell anemia patients from Salvador, Bahia, Northeastern Brazil. **Braz. J. Med. Bio. Res.** 36 (10): 1283-1288, 2003.

GORY-FAURÉ, S.; PRANDINI, M. H.; POINTU, H.; ROULLOT, V.; PIGNOT-PAINTRAND, I.; VERNET, M.; HUBER, P. Role of vascular endothelial –cadherin in vascular morphogenesis. **Development**, 126: 2096-2102, 1999.

GRATAMA, J. W.; ORFAO, A.; BARNETTE, D.; BRANDO, B.; HUBER, A.; JANOSSY, G.; JOHNSON, H. E.; KEENEY, M.; MARTI, G. E.; PREIJERS, F.; ROTHE, G.; SERKE, S.; SUTHERLAND, D. R.; SCHOOT, C. E. V. D.; SCHMITZ, G.; PAPA, S. Flow cytometry enumeration of CD34⁺ hematopoietic stem and progenitor cells. **Cytometry**, 34: 128-142, 1998.

GRISAR, Johannes; ALETAHA, Daniel; STEINER, Carl W.; KAPRAL, Theresa; STEINER, Sabine; SEIDINGER, Daniela; WEIGEL, Günter; SCHWARZINGER, Ilse; WOŁOZCSZUK, Wolfgang; STEINER, Günter; SMOLEN, Josef S. Depletion of Endothelial Progenitor Cells in the Peripheral Blood of Patients With Rheumatoid Arthritis **Circulation**. 111:204-211, 2005.

GRAIDO-GONZALEZ, Evangeline; DOHERTY, James C. ; BERGREEN, Eric W. ; ORGAN, Gregory; TELFER, Margaret; MCMILLEN, Marvin A. Plasma endothelin-1, cytokine, and prostaglandin E₂ levels in sickle cell disease and acute vaso-occlusive sickle crisis. **Blood**, 92(7): 2551-2555, 1998.

GROVE, Joanna E.; BRUSCIA, Emanuela; KRAUSE, Diane S. Plasticity of Bone Marrow-Derived Stem Cells. **Stem Cells**, 22: 487-500, 2004.

GUEZGUEZ, B.; VIGNERON, P.; LAMERANT, N.; KIEDA, C.; JAFFREDO, T.; DUNON, T. Dual role of melanoma cell adhesion molecule (MCAM)/ CD146 in lymphocyte endothelial interaction: MCAM/ CD146 promotes rolling via microvilli induction in lymphocyte and is an endothelial adhesion receptor. **The Journal of Immunology**, 179: 6673-6685, 2007.

HERNIGOU, Phillipe; BACHIR, D.; GALACTEROS, F. The natural history of symptomatic osteonecrosis in adults with sickle cell. **J. Bone Joint Surg. Am.**, 85-A (3): 500-4, 2003.

HERNIGOU, Phillipe; BEAUJEAN, Françoise. Abnormalities in the Bone Marrow of the Iliac Crest in Patients Who Have Osteonecrosis Secondary to Corticosteroid Therapy or Alcohol abuse. **J Bone Joint Surg Am.**, 79:1047-53, 1997.

HERNIGOU, Phillipe; BEAUJEAN, Françoise. Treatment of osteonecrosis with autologous bone marrow grafting. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, 405: 14-23, 2002.

HERNIGOU, Phillipe; DALTRO, Gildásio Cerqueira; FILIPINI, Paolo; MUKISI-MUKASA, Martin; MANICOM, Olivier. Percutaneous Implantation of Autologous Bone Marrow Osteoprogenitor Cells as Treatment of Bone Avascular Necrosis Related to Sickle Cell Disease **The Open Orthopaedics Journal**, 2: 62-65, 2008.

HERNIGOU, Phillipe; HABIBI, A.; BACHIR, D.; GALACTEROS, F. The natural history of asymptomatic osteonecrosis of the femoral head in adults with sickle cell disease. **J. Bone Joint Surg. Am.**, 88(12): 2565-72, 2006.

HERNIGOU, Phillipe; POIGNARD, A.; BEAUJEAN, Françoise; ROUARD, H. Percutaneous autologous bone marrow grafting nonunion. Influence of the number and concentration of progenitor cells. **The Journal of Bone & Joint Surgery**, 87: 1430-1037, 2005.

HERZOG, Erica L.; CHAI, Li.; KRAUSE, Diane S. Plasticity of bone marrow-derived stem cells. **Blood**, 102: 3483-3493, 2003.

HIGASHI, Yukihiro; KIMURA, Masashi; HARA, Keiko; NOMA, Kensuke; JITSUIKI, Daisuke; NAKAGAWA, Keigo; OSHIMA, Tetsuya; CHAYAMA, Kazuaki; SUEDA, Taijiro; GOTO, Chikara; MATSUBARA, Hiroaki; MUROHARA, Toyoaki; YOSHIZUMI, Masao. Autologous Bone-Marrow Mononuclear Cell Implantation Improves Endothelium-Dependent Vasodilation in Patients With Limb Ischemia. **Circulation**, 109: 1215-1218, 2004.

HRISTOV, Mihail; Wolfgang; WEBER, Peter C. Endothelial Progenitor Cells: Mobilização, Differentiation and Homing. **Arterioscler Thromb Vasc Biol.**, 23:1185-1189, 2003.

IAMAMURA, H.; OHTA, T.; TSUNETOSHI, K.; DOI, K.; NOZAKI, K.; KIKUTA, K. I. Transdifferentiation of bone marrow-derived endothelial progenitor cells into the smooth muscle cell lineage mediated by transforming growth factor- β 1. **Atherosclerosis**, 211: 114-121, 2010.

ILIC, Dusko; POLAK, Julia M. Stem Cell in regenerative medicine: Introduction. **British Medical Bulletin**, 98:117-126, 2011.

INGRAM, D. A.; LIEN, I. Z.; MEAD, L. E.; ESTES, M.; PRATER, D. N.; DERR-YELLIN, E.; DIMEGLIO, L. A.; HANELINE, L. S. In vitro hyperglycemia or a diabetic intrauterine environment reduces neonatal endothelial colony-forming cells numbers and function. **Diabetes**, 57: 724-731, 2008.

INGRAM, D. A.; MEAD, L. E.; TANAKA, H.; MEADE, V.; FENOGLIO, A.; MORTELL, K.; POLLOK, K.; FERKOWICZ, M. J.; GILLEY, D.; YODER, M. C. Identification of a novel hierarchy of endothelial progenitor cells using human peripheral and umbilical cord blood. **Blood**, 104: 2752-2760, 2004.

INGRAM, David A.; MEAD, Laura E.; MOORE, Daniel B.; WOODARD, Wayne; FENOGLIO, Amy; YODER, Mervin C. Vessels wall-derived endothelial cells rapidly proliferate because they contain a complete hierarchy of endothelial progenitor cells. **Blood**, 105 (7): 2783-2786, 2005.

JAFFREDO, T.; BOLEROT, K.; SUGIYAMA, D.; GAUTIER, R.; DREVON, C. Tracing the hemangioblast during embryogenesis: developmental relationships between endothelial and hematopoietic cells. **Int. J. Dev. Biol**, 49: 269-277, 2005.

JANIC, B.; ARBAB, A. S. The role and therapeutic potential of endothelial progenitor cells in tumor neovascularization. **Scientific World Journal**, 2010.

JONES, Kevin B.; SESHADRI, Tara; KRANTZ, Roselynn; KEATING, Armand; FERGUSON, Perte C. Cell-Based Therapies for Osteonecrosis of the Femoral Head. **Biol Blood Marrow Transplant**, 14: 1081-1087, 2008.

JIALAL, I.; DEVARAJ, S.; SINGH, U.; HUET, B. A. Decreased number and impaired functionality of endothelial progenitor cells in subjects with metabolic syndrome: Implications for increased cardiovascular risk. **Atherosclerosis**, 2010.

JIN, F.; ZHAI, Q.; QIU, L.; MENG, H.; ZOU, D.; WANG, Y.; LI, Q.; YU, Z.; HAN, J.; LI, Q. Degradation of BM SDF-1 by MMP9: the role in G-CSF-induced hematopoietic stem/progenitor cell mobilization. **Bone Marrow Transplantation**, 1-8, 2008;

JOÃO, Cristina. Von Willebrand disease. **Medicina Interna**, 8(1): 28-36, 2001.

JUNHUI, Z.; XINGXIANG, W.; GUOSHENG, F.; YUNPENG, S.; FURONG, Z.; JUNZHU, C.; Reduced number and activity of circulating endothelial progenitor cells in patients with idiopathic pulmonary arterial hypertension. **Respiratory Medicine**, 102: 1073-1079, 2008.

KARATOPRAK, Omer; KORKMAZ, Mehmet Fatih; KARA, Ayhan Nedim; GOGUS, Abdullah; ISIKLAR, Zekeriya Ugur. Early results of autologous mononuclear bone marrow cell transplantation in nontraumatic avascular necrosis of the femoral head. **Acta Orthop Traumatol Turc**, 42(3):178-18, 2008.

KERACHIAN, Mohammad Amin; HARVEY, Edward J.; COURNOYER, Denis; CHOW, Terry Y. K.; SÉGUIN, Shantal. Avascular Necrosis of the Femoral Head: Vascular Hypotheses. **Endothelium**, 13:237-244, 2006.

KATO, Gregory J. ; GLADWIN, Mark T. ; STEINBERG, Martin H. Deconstructing sickle cell disease: reappraisal of the role of hemolysis in the development of clinical subphenotypes. **Blood Reviews**, 21: 37-47, 2007.

LAFFORGUE, Pierre. Pathophysiology and natural history of avascular necrosis of bone. **Joint Bone Spine**, 73: 500-507, 2006.

LANARO, C.; FRANCO-PENTEADO, C. F.; ALBUQUEQUE, D. M.; SAAD, S. T. O.; CONRAN, N.; COSTA, F. F. Altered levels of cytokines and inflammatory mediators in plasma and leukocytes of sickle cell anemia patients and effects of hydroxyurea therapy. **J. Leukoc. Biol.** 85: 235–242; 2009.

LANDBURG, P. P.; NUR, E.; MARIA, N.; BRANDJES, D. P.; BIEMOND, B. J.; SCHNOG, J. B.; DUIJS, A. J.; Elevated circulating stromal-derived factor-1 levels in sickle cell disease. **Acta Haematol.** 122(1): 64-9, 2009.

LIAO, Y. F.; CHEN, L. L.; ZENG, T. S.; LI, Y. M.; YU, F.; HU, L. J.; YUE, L. Number of circulating endothelial progenitor cells as a marker of vascular endothelial function for type 2 diabetes. **Vascular Medicine**, 15(4): 279-285, 2010.

LIN, Yi; WEISDORF, Daniel J.; SOLOVEY, Anna; HEBBEL, Robert P. Origins of circulating endothelial cells and endothelial outgrowth from blood. **The Journal of Clinical Investigation**, 105(1): 71-77, 2000.

LUCK, L.; ZENG, L.; HITI, A. L.; WEINBERG, A. L.; MALIK, P. Human CD34(+) and CD34(+)CD38(-) hematopoietic progenitors in sickle cell disease differ phenotypically and functionally from normal and suggest distinct subpopulations that generate Fcells. **Experimental Hematology**, 32(5): 483-93, 2004.

MAGEN, E.; FELDMAN, A; COHEN, Z.; ALON, D. B.; MINZ, E.; CHERNYAVSKY, A.; LINOVA, L.; MISHAL J.; SCHLEZINGER, M.; STHOEGER, Z. Circulating endothelial progenitor cells, Th1/ Th2/ Th17- Related cytokines, and endothelial dysfunction in resistant hypertension, **The American Journal of the Sciences**, 339 (2): 117-122, 2010.

MAHADEO, K. M.; OYEKU, S.; TARAGIN, B.; RAJPATHAK, S. N; MOODY, K.; SANTIZO R.; DRISCOLL, M. C. Increased prevalence of osteonecrosis of the femoral head in children and adolescents with sickle-cell disease. **American Journal Hematology**, 86(9): 806-8, 2011.

MALIZOS, Konstatinos N.; KARANTANAS, Apostolos H.; VARITIMIDIS, Sokratis E.; DAILIANA, Zoe H.; BARGIOTAS, Konstatinos; MARIS, Thomas. Osteonecrosis of femoral head: Etiology, imaging and treatment. **European Journal of Radiology**, 63: 16-28, 2007.

MAKIS, A. C. ; HATZIMICHAEL, E. C. ; BOURANTAS, K. L. The role of cytokines in sickle cell disease. **Ann. Hematol.**, 79: 407-413, 2000.

MEYER, S. F. D.; DECKMYN, H.; VANHOORELBEKE, K. von Willebrand factor to the rescue. **Blood**, 113: 5049-5057, 2009.

MÖBIUS-WINKLER, S.; HÖLLRIEGEL, R.; SCHULER, G.; ADAMS, V. Endothelial progenitor cells: Implications for cardiovascular disease. **Cytometry part A**, 75A: 25-37, 2009.

MOONEN, Jan Renier AJ; LEEUW, Karina De; SEIJEN, Xavier J Gallego Y Van; KALLENBERG, Cees G. M.; LUYN, Marja J. A. Van; BIJL, Marc; HARMSSEN, Martin C. Reduced number and impaired function of circulating progenitor cells in patients with systemic lupus erythematosus. **Arthritis Research & Therapy**, 9: 84, 2007.

MORRIS, Claudia R. Mechanisms of Vasculopathy in Sickle Cell Disease and Thalassemia. **Hematology**. 177-185, 2008.

MUKISI-MUKASA, Martin; GOMEZ-BROUCHET, Anne; DONKERWOLCKE, Monique; HINSENKAMP, Maurice; BURNY, Franz. Histopathology of aseptic necrosis of the femoral head in sickle cell disease. **International Orthopaedic**, 2010.

MÜLLER, I. ; VAEGLER, M. ; HOLZWARATH, C. ; TZARIBATCHEV, N. ; PFISTER, S. M. ; SCHÜTT, B. ; REIZE, P. ; GREIL, J. ; HANDGRETINGER, R. ; RUDERT, M. Secretion of angiogenic proteins by human multipotent mesenchymal stromal cells and their clinical potential in the treatment of avascular osteonecrosis. **Leukemia**, 21, 2008.

MURAKAMI, M.; SIMONS, M. Fibroblast growth factor regulation of neovascularization. **Curr. Opin. Hematol**, 15(3): 215-220, 2008.

NETO, F. Moreira; LOURENÇO, D. M.; NOGUTI, M. A. E.; MORELLI, V. M.; GIL, I. C. P.; BELTRÃO, A. C. S.; FIGUEIREDO, M. S. The clinical impact of MTHFR polymorphism on the vascular complications of sickle cell disease. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, 39:1291-1295, 2006.

NOLAN, Viki G.; ADEWOYE, Adeboye; BALDWIN, Clinton; WANG, Ling; MA, Qiant; WYSZYNSKI, Diego F.; FARREL, John J.; SEBASTIANI, Paola; FARRER, Lindsay A.; STEINBERG, Martin H. Sickle Cell Leg Ulcers: Associations with Hemolysis and SNPs in Klotho, TEK and Genes of the TGF- β /BMP Pathway: **Br. J. Haematol**, 133 (5): 570-578, 2006.

OKPALA, Iheanyi. The intriguing contribution of white blood cells to sickle cell disease – a red cell disorder. **Blood Reviews**, 18: 65-73, 2003.

OREFFO, R. O.; COOPER, C.; MASON, C.; CLEMENTS, M. Mesenchymal stem cells: lineage, plasticity, and skeletal therapeutic potential. **Stem Cell Rev.**, 1 (2): 169-78, 2005.

ORKIN, Stuart H.; HIGGIS, Douglas R. Sickle Cell Disease at 100 years. **Science**, 329: 291-292, 2010.

OSTO, Helena, CASTELLANI, Chiara; FADINI, Gian Paolo; BAESSO, Ilenia; GAMBINO, Antonio; AGOSTINI, Carlo; AVOGARO, Angelo; GEROSA, Gino; THIENE, Gaetano; ILICETO, Sabino; ANGELINI, Annalisa; TONA, Francesco. Impaired endothelial progenitor cell recruitment may contribute to heart transplant microvasculopathy. **The Journal of Heart and Lung Transplantation**, 2010.

OSWALD, Joachim; BOXBERGER, Sabine; JORGENSEN, Birgitte; FELDMANN, Silvia; EHNINGER, Gerhard; BORNHÄUSER, Martin; WERNER, Carsten. Mesenchymal Stem Cells Can Be Differentiated Into Endothelial Progenitor Cells In Vitro. **Stem Cells**, 22: 377-384, 2004.

OTROCK, Zaher K. ; MAHFOUZ, Rami A. R. ; MAKAREM, Jawad A. ; SHAMSEDDINE, Alli I. Understanding the biology of angiogenesis: Review of the most important molecular mechanisms. **Blood Cells, Molecules and Diseases**, 39: 212-220, 2007.

PAGNIER, Josée; MEARS, J. Gregory; DUNDA-BELKHODJA, Olga; SCHAEFER-REGO, Kim E.; BELDJORD, Cherif; NAGEL, Ronald L.; LABIE, Dominique. Evidence for the multicentric origin of the sickle cell hemoglobin gene in Africa. **Proc. Natl. Acad. Sci**, 81: 1771-1773, 1984.

PAKÓZDI, A.; BESENEYEI, T.; PARAGH, G.; KOCH, A. E.; SZECANECZ, Z. Endothelial progenitor cells in anhrithis-associated vasculogenesis and atheriogenesis. **Joint bone Spine**, 76(6): 581-583, 2009.

PAPA, N. D.; QUIRICI, N.; SOLIGO, D.; SCAVULLO, C.; CORTIANA, M.; BORSOTTI, C.; MAGLIONE, W.; COMINA, D. P.; VITALI, C.; FRATICELLI, P.; GABRIELLI, A.; CORTELEZZI, A.; LAMBERTENGGI-DELILIERI, G. Bone marrow endothelial progenitor are defective in systemic sclerosis. **Arthritis & Rheumatism**, 54(8): 2605-2615, 2006.

PATENAUDE, A.; PARKER, J.; KARSAN, A. Involvement of endothelial progenitor cells in tumor vascularization. **Microvascular Research**, 2010.

PERIN, Emerson C. ; DOHMANN, Hans F. R. ; BOROJEVIC, Radovan; SILVA, Suzana A. ; SOUZA, Andre L. S. ; MESQUITA, Claudio T. ; ROSSI, Maria I. D. ; CARVALHO, Antonio C. ; DUTRA, Helio S. ; DOHMANN, Hans J. F. ; SILVA, Guilherme V. ; BELÉM, Luciano; VIVACQUA, Ricardo; RANGEL, Fernando O. D. ; ESPORCATTE, Roberto; GENG, Yong J. ; VAUGHN, William K. ; ASSAD, Joao A. R. ; MESQUITA, Evandro T. ; WILLERSON, James T. Transendocardial, Autologous Bone Marrow Cell Transplantation for Severe, Chronic Ischemic Heart Failure. **Circulation**, 107:2294-2302, 2003.

PHINNEY, Donald, G.; PROCKOP, Darwin G. Concise Review: Mesenchymal stem/Multipotent Stromal Cells: The state of differentiation and modes tissue repair – Current views. **Stem Cells**, 25: 2896-2902, 2007.

PRATER, D. N.; CASE, J.; INGRAM, D. A.; YODER, M. C. Working hypothesis to redefine endothelial progenitor cells. **Leukemia**, 1-9, 2007.

PRUSZAK, J.; LUDWIG, W.; BLAK, A.; ALAVIAN, K.; ISACSON, O. CD15, CD24 and CD29 define a surface biomarker code for neural lineage differentiation of stem cells. **Stem Cells**, 27: 2928-2940, 2009.

REES, David C.; WILLIAMS, Thomas N.; GLADWIN, Mark T. Sickle-Cell Disease. **Lancet**, 376: 2018-31, 2010.

REGE, T. A.; HAGOOD, J. S. Thy-1 as a regulator of cell-cell and cell-matrix interactions in axon regeneration, apoptosis, adhesion, migration, cancer, and fibrosis. **The FASEB Journal**, 20: 1045-1054, 2006.

RIBATTI, D. The discovery of endothelial progenitor cells. An historical review. **Leuk. Res.** 31(4): 339-44, 2007.

RODRIGUEZ, C.; SLEVIN, M.; RODRÍGUEZ-CALVO, R.; KUMAR, S. KRUPINSK, J.; TEJERINA, T.; MARTÍNEZ-GONZÁLEZ, J. Modulation of endothelium and endothelial progenitor cell function by low-density lipoprotein: Implications for vascular repair, angiogenesis and vasculogenesis. **Pathobiology**, 76: 11-32, 2009.

SACCHETTI, Benedetto; FURANI, Alessia; MICHIENZI, Stefano; CESARE, Silvia Di; PIERSANTI, Stefania; SAGGIO, Isabella; TAGLIAFICO, Enrico; FERRARI, Stefano; ROBEY, Pamela GEHRON; RIMINUCCI, Mara. Self-Renewing Osteoprogenitors in Bone Marrow Sinusoids Can Organize a Hematopoietic Microenvironment. **Cell**, 131 (19): 324-336, 2007.

SCHATTEMAN, G. C.; AWAD, O. Hemangioblast, angioblast, and adults endothelial cell progenitors. **The Anatomical Record part A**, 276 A: 13-21, 2004.

SCHMIDT, A.; BRIXIUS, K.; BLOCH, W. Endothelial precursor cell migration during vasculogenesis. **Circulation Research**, 101: 125-136, 2007.

SCHNOG, J. B. ; DUIT, A. J. ; MUSKIET, F. A. ; TEN CATE, H. ; ROJER, R. A. ; BRANDJES, D. P. Sickle cell disease; a general overview. **Neth. J. Med.**, 62 (10): 364-374, 2004.

SEGUERS, Vincent F. M.; LEE, Richard T. Stem cell therapy for cardiac disease. **Nature**, 451: 937-942, 2008.

SÉGUIN, C.; KASSIS, J.; BUSQUE, L.; BESTAWROS, A.; THEODOROSPOULOS, J.; ALONSO, M. L.; HARVEY, E. J. Non-traumatic necrosis of bone (osteonecrosis) is associated with endothelial cell activation but not thrombophilia. **Rheumatology**, 47: 1151-1155, 2008.

SENEGAGLIA, Cristina. Células progenitoras endoteliais de sangue de cordão umbilical humano: Purificação, expansão e diferenciação, **Pontifícia Universidade Católica do Paraná**, 2007.

SERJEANT, G. One Hundred Years of Sickle Cell Disease. **Br. J. Haematol.**, 151(5): 425-9, 2010.

SHANTSILA, Eduard; WATSON, Timothy; TSE, Hung-Fat; LIP, Gregory Y. H. New Insights on endothelial progenitor cell subpopulations and their angiogenic properties. **Journal of the American College of Cardiology**, 51 (6): 669-671, 2008.

SIEVEKING, Daniel P. ; BUCKLE, Andrew; CELERMAJER, David S. ; NG, Martin K. C. Strikingly different angiogenic properties of endothelial progenitor cell subpopulations: Insights from a novel human angiogenesis assay. **Journal of American College of Cardiology**, 51 (6): 660-668, 2008.

SILVA, Rita; D'AMICO, Gabriela; HODIVALA-DILKE, Kairbaan; REYNOLDS, Louise E. Integrins: The keys to unlocking angiogenesis. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, 28: 1703-1713, 2008.

SIMONS, D. L.; TAN, S. TENEN, D. G.; NICHOLSON-WELLER, A.; SEED, B. Monocyte antigen CD14 is a phospholipid anchored membrane protein. **Blood**, 73: 284-289, 1989.

SMET, Frederik De; SEGURA, Immaculada; BOCK, Katrien De; HOHENSINNER, Philipp J.; CARMELIET, Peter. Mechanisms of branching. Filopodia on endothelial tip cells lead the way. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**. 2009.

SOLOVEY, Anna; GUI, Lizhen; RAMAKRISHNAN, Sundaram; STEINBERG, Martin H. ; HEBBEL, Robert P. Sickle cell anemia as a possible state of enhanced anti-apoptotic tone: survival effect of vascular endothelial growth factor on circulating and unanchored endothelial cells. **Blood**, 93 (11): 3824-3830, 1999.

STEINBERG, M. H. Predicting clinical severity in sickle cell anaemia. **British Journal of Haematology**, 129: 465-481, 2005.

STEINBERG, Martin H.; BRUGNARA, Carlo. Pathophysiological-Based Approches to Treatment of Sickle Cell Disease. **Ann. Rev. Med.**, 54:89-112, 2003.

STRAUER, B. E.; BREHM, M.; SCHANNWELL, C. M.; The therapeutical potential of stem cells in heart disease. **Cell Proliferation**, 41: 126-45, 2008.

STUART, Marie J.; NAGEL, Ronald L. Sickle-Cell Disease. **Lancet**, 364(9): 1343-1360.

TAN, K.; LESSIEUR, E.; CUTLER, A.; NERONE, P.; VASANJI, A.; ASOSINGH, K.; ERZURUM, S.; ANAND-APTE, B. Impaired function of circulating CD34⁺ CD45⁻ cells in patients with proliferative diabetic retinopathy. **Experimental Eye Research**, 91: 229-237, 2010.

TÁRNOK, A.; ULRICH, H.; BOCZI, J. Phenotypes of stem cells from diverse origin. **Cytometry part A**, 77A: 6-10, 2010.

TATEISHI-YUYAMA, E. ; MATSUBARA, H. ; MOROHARA T. ; IKEDA, U. ; SHINTANI S. ; MASAKI H. ; AMANO, K. ; KISHIMOTO, Y. ; YOSHIMOTO, K. ; AKASHI, H. ; SHIMADA, K. ; IWASAKA, T. ; IMAIZUMI, T. Therapeutic angiogenesis using cell transplantation (TACT) study investigator. Therapeutic angiogenesis for patients with limb ischaemia by aucontrolled trial. **Lancet**, 360: 427-435, 2002.

TIMMERMANS, Frank; HAUWERMEIREN, Filip Van; DE SMEDT, Magda; RAEDT, Robrecht; PLASSCHAERT, Frank; DE BUYZERE, Marc L.; GILLEBERT, Thierry C.; PLUM, Jean; VANDEKERCKHOVE, Bart. Endothelial Outgrowth Cells Are Not Derived From CD133⁺ Cells or CD45⁺ Hematopoietic Precursors. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, 27: 1572-1579, 2007.

TOUSOULIS, Dimitris; ANDREOU, Joannis; ANTONIADES, Charalambos; TENTOLOURIS, Costas; STEFANADIS, Christodoulos. Role of Inflammation and oxidative stress in endothelial progenitor cell function and mobilization: Therapeutic implications for cardiovascular diseases. **Atherosclerosis**, 201: 236, 247, 2008.

TRIPODO, C.; BERNARDO, A. D.; TERNULLO, M. P.; GUARNOTTA, C.; PORCASI, R.; INGRAO, S.; GIANELLI, U.; BOVERI, E.; IANNITTO, E.; FRANCO, G.; FLORENA, A. M. CD146⁺ bone marrow osteoprogenitors increased in the advanced stages of primary myelofibrosis. **Haematologica**, 94(1): 127-130, 2009.

TROUNSON, Alan; THAKAR, RAHUL, G.; LOMAX, Geoff; GIBBONS, Don. Clinical trials for stem cell therapies. **BMC Medicine**, 9:52, 2011.

TURA, O.; BARCLAY, G. R.; RODDIE, H.; DAVIES, J.; TURNER, M. L. Absence of the relationship between immunophenotypic and colony enumeration analysis of endothelial

progenitor cells in clinical haematopoietic cell sources. **Journal of Translational Medicine**, 2007.

ULUG, Pinar; VASAVDA, Nisha; AWOGBADE, Moji; CUNNINGHAM, Juliette, MENZEL, Stephan; THEIN, Swee Lay. **Ann. Hematol.** 88-803-805, 2009.

UMEMURA, T.; HIGASHI, Y. Endothelial progenitor cells: Therapeutic target for cardiovascular diseases. **J. Pharmacol Sci.**, 108: 1-6, 2008.

URBICH, Carmen; DIMMELER, Stephanie. Endothelial progenitor cells: Characterization and role in vascular biology. **Circulation Research**, 95: 343-353, 2004.

VEROGA, Deike; DRESCHER, Wolf; PUFE, Melanie; GROTH, Godo; PUFE, Thomas. Differential expression of vascular endothelial growth factor in glucocorticoid-related osteonecrosis of the femoral head. **Clin. Orthop. Relat. Res.**, 467: 3273-3282, 2009.

VILLEROCHÉ, V. J.; AVOUAC, J.; PONCEAU, A.; RUIZ, B.; KAHAN, A.; BOILEAU, C.; UZAN, G.; ALLANORE, Y. Enhanced late outgrowth circulating endothelial progenitor cells levels in rheumatoid arthritis and correlation with disease activity. **Arthritis Research & Therapy**, 12, 2010.

WANG, D.; LEHMAN R. E.; DONNER D. B.; MATLI M. R.; WARREN R. S.; WELTON M. L. Expression and endocytosis of VEGF and its receptors in human umbilical vascular endothelial cell. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.**, 282(6): 1088-96, 2002.

WANG, G.; ZHANG, C. G.; SUN, Y.; FENG, Y.; CHEN, S. B.; CHENG, X. G.; ZENG, B. F. Changes in femoral head blood supply and vascular endothelial growth factor in rabbit with steroid-induced osteonecrosis. **The Journal International Medical Research**, 38: 1060-1069, 2010.

WARE, H. E.; BROOKS, A. P.; TOYE, A. P.; BERNEY, S. I. Sickle cell disease and silent avascular necrosis of the hip. **The Journal of Bone and Joint Surgery**, 73(6): 947-9, 1991.

WATT, Suzanne M.; ATHANASSOPOULOS, Athanasios; HARRIS, Adrian L.; TSAKNAKIS, Grigorios. Human endothelial stem/progenitor cells, angiogenic factor and vascular repair. **Journal of The Royal Society**, 2010.

WESTERWEEL, P. E.; LUIJTEN, R. K. M. A.; HOEFER, I. E.; KOOMANS, H. A.; DERKSEN, R. H. W. M. Haematopoietic and endothelial progenitor cells are deficient in quiescent systemic lupus erythematosus. **Ann. Rheum. Dis**, 66: 865-870, 2007.

WILSON, Brent D.; LI, Masaaki; PARK, Kye Won; SULI, Arminda; SORENSEN, Lise K.; LARRIEU-LAHARGUE, Frédéric; URNESS, Lisa D.; SUH, Wonhee; ASAI, Jun; KOCK, Gerhardus A. H.; THORNE, Tina; SILVER, Marcy; THOMAS, Kirk; CHIEN, Chi-Bin; LOSORDO, Douglas W.; LI, Dean Y. Netrins promote developmental and therapeutical angiogenesis. **Science**, 313: 640-644, 2006.

WU, Catherine J.; KRISHNAMURTI, Lakshamanan; KUTOK, Jeffery L. BIERNACKI, Melinda; ROGERS, Shelby; ZHANG, Wandi; ANTIN, Joseph H.; RITZ, Jerome. Evidence for ineffective erythropoiesis in severe sickle cell disease, **Blood**, 106(10): 3639-3645, 2005.

XIONG, Jing Wei. Molecular and developmental biology of the hemangioblast. **Developmental Dynamics**, 237: 1218-1231, 2008.

YODER, Marvin C. ; MEAD, Laura E. ; PRATER, Daniel; KRIER, Thereza R. ; MROUEH, Karim N. ; LI, Fang; KRASICH, Rachel; TEMM, Constance J. ; PRCHAL, Josef T. ; INGRAM, David A. Redefining endothelial progenitor cells via clonal analysis and hematopoietic stem/progenitor cell principals. **Blood**, 109 (5): 1801-1809, 2007.

YU, J. X.; HUANG, X. F.; LV, W. M.; YE, C. S.; PENG, X. Z.; ZHANG. H.; XIAO. L. B.; WANG, S. M. Combination of stromal-derived factor-1 α and vascular endothelial growth factor gene modified endothelial progenitor cells is more effective for ischemic neovascularization. **J. Vasc. Surg.**, 50: 608-16, 2009.

ZAGO, Marco Antônio; PINTO, Ana Cristina. The Pathophysiology of sickle cell disease: from the genetic mutation to multiorgan disfunction. **Rev. Bras. Hematol. Hemot.**, 29 (3): 207-214, 2007.

ZHANG, Ge; SHENG, Hui; HE, Yi-Xin; XIE, Xin-Hui; WANG, Yi-Xiang; LEE, Kwong-Man; YEUNG, Ka-Wai; LI, Zi-Rong; HE, Wei; GRIFFITH, James F.; LEUNG, Kwok-Sui; QIN, Ling. Continuous Occurrence of Both Insufficient Neovascularization and Elevated Vascular Permeability in Rabbit Proximal Femur During Inadequate Repair of Steroid Associated Osteonecrotic Lesions. **Arthritis & Rheumatism**, 60(10): 2966-2977, 2009.

Aumentada Frequência de Células Progenitoras Endoteliais CD34⁺/KDR⁺/CD45^{low/-} na Medula Óssea de Pacientes com Anemia Falciforme Portadores de Osteonecrose

Autores:

Eliane Silva de Souza ¹, Marcela Miranda Salles ¹, Songeli Menezes Freire ¹, Rosalinda Guedes ¹, Gildásio de Cerqueira Daltro ², Roberto Meyer ¹, Vitor Antonio Fortuna ¹

1. Laboratório de Imunologia, Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia
2. Departamento de Cirurgia, Faculdade de Medicina, Universidade Federal da Bahia.

Correspondência para: Vitor Antonio Fortuna, LABIMUNO-ICS-UFBA, Av. Reitor Miguel Calmon, s/n- Vale do Canela, Salvador, BA, 40110100-Brasil

Phone: 557132359682 R-246

E-mail: vfort@ufba.br

Resumo:

As Células Progenitoras Endoteliais (CPEs) são células liberadas na circulação potencialmente envolvidas na neovascularização de tecidos isquêmicos. A anemia falciforme é caracterizada pela oclusão microvascular, vasculopatia e inflamação crônica. Neste estudo avaliamos o número de CPEs de sangue periférico e medula óssea de pacientes falciformes. Vinte e três voluntários, clinicamente estáveis com anemia falciforme e oito controles saudáveis foram recrutados como aprovado pelo comitê de ética. Sete pacientes com anemia falciforme que apresentaram osteonecrose e foram submetidos ao transplante de células mononucleares da medula óssea foram recrutados neste estudo. CPEs foram quantificadas por citometria de fluxo através da expressão dos marcadores CD34, KDR, CD45 e CD34, KDR, CD133. Os níveis plasmáticos de citocinas pró-angiogênicas como VEGF, SDF-1 α e TGF- β e inflamatória TNF foram dosadas. As análises de citometria mostraram um número elevado de progenitores endoteliais CD34+/KDR+/CD45-/low e CD34+/KDR+/CD133+ na medula óssea e progenitores hematopoéticos CD34+/CD45+ no sangue periférico de pacientes falciformes. Os níveis das citocinas TGF- β e VEGF foram encontrados elevados entre os pacientes falciformes quando comparado ao controle. Esses resultados corroboram com estresse hematopoético e endotelial da doença.

Introdução

A anemia falciforme é uma desordem genética caracterizada por complicações fisiopatológicas entre elas, uma intensa hemólise, estresse hematopoético, vasculopatia, e danos teciduais (CROIZAT E NAGEL, 1999; REES et al, 2011). Essa doença pode apresentar uma diversidade de manifestações clínicas decorrentes de complicações vaso-oclusivas como acidente vascular cerebral, síndrome torácica aguda e osteonecrose (ZAGO & PINTO, 2007). A necrose avascular da cabeça do fêmur é uma doença recalcitrante, caracterizada pela morte de osteócitos e da medula óssea. Embora seu mecanismo fisiopatológico ainda não esteja elucidado, as alterações parecem estar relacionadas ao inadequado suprimento sanguíneo no seguimento afetado do osso subcondral (MALIZOS et al, 2007). A incidência tem aumentado cada ano com cerca de 10.000 a 20.000 novos casos por ano nos EUA. Embora apenas um fêmur seja afetado, inicialmente, o comprometimento bilateral em dois anos pode alcançar acima de 72% (MUKISI-MUKASA et al, 2000; MALIZOS et al, 2007; MAHADEO et al, 2011). O tratamento depende do grau de comprometimento da lesão óssea, o que está relacionado com a precocidade do diagnóstico (MALIZOS et al, 2007).

Nos últimos anos o transplante autólogo de células mononucleares da medula óssea (CMMO) tem configurado uma importante alternativa terapêutica para doenças ortopédicas, sobretudo em estágios iniciais da osteonecrose (KARATOPRAK et al, 2008; GANGJI & HAUZEUR, 2010). Em pacientes falciformes essa terapia tem sido utilizada com sucesso desde 1994 por Hernigou e colaboradores (HERNIGOU et al, 1997; HERNIGOU & BEAUJEAN, 2002; JONES et al, 2008; HERNIGOU et al, 2008). No Brasil um trabalho pioneiro de DALTRO e colaboradores têm apresentado resultados satisfatórios. Os pacientes submetidos ao procedimento de implante de CMMOs apresentaram melhoras clínicas e radiográficas consideradas (DALTRO *et al*, 2008). Contudo os mecanismos celulares que governam essa terapia ainda permanece desconhecido. A cavidade medular é o nicho biológico de pelo menos três possíveis células-tronco, que potencialmente participariam do mecanismo de reparo mediado por células na terapia celular, as células-tronco hematopoiéticas, células-tronco mesenquimais CTM (Mesenchymal Stem Cells - CTMs) e células progenitoras endoteliais CPEs (BEYTH et al, 2011)

Asahara e colaboradores reportaram o isolamento da putativa CPE do sangue periférico humano, originada da medula óssea. ASAHARA et al (1997) observou a presença de progenitores, originadas de células CD45⁺ com potencial angiogênico que foram capazes

de promover neoangiogênese *in vivo*. Diversas subpopulações das células com potencial angiogênico tem sido descrito da literatura com distintos fenótipos celulares e diferentes mecanismos angiogênicos. Na literatura as células CD34⁺/CD133⁺/KDR⁺ e CD34⁺/KDR⁺/CD45^{low/-} tem sido descritas representar as CPEs. (RIBATTI, 2007; YODER et al, 2007; FADINI et al, 2008; WATT et al, 2010). CASE et al (2007) observaram que as células CD34⁺/KDR⁻/CD133⁺ não formaram CPEs, mas progenitores hematopoiéticos que expressaram CD45. De forma semelhante TIMMERMANS et al (2007) investigaram a possível relação entre as “Endothelial Outgrowth Cells - OECs” e expressão fenotípica de CD34 e CD133 e constaram que essas células não são originadas de precursores CD45⁺ ou CD133⁺, mas de precursores CD45^{low}. Assim as células CD34⁺/KDR⁺/CD45^{low/-} parece fazer parte da população das OECs inicialmente descritas por LIN et al (2000), enquanto que as células CD34⁺/KDR⁻/CD133⁺ representaria a população celular descrita por ASAHARA e colaboradores.

As CPEs circulantes têm sido encontradas elevadas em doenças vasculares agudas enquanto em condições crônicas sua frequência está reduzida (HRISTOV et al, 2003). Na doença falciforme BEEM et al (2009) observaram uma elevada frequência desses progenitores em pacientes falciformes em crises vaso-oclusivas, enquanto em pacientes estáveis não foram identificados esses progenitores. Os níveis aumentados de CPEs nesses pacientes parecem estar relacionados aos níveis elevados de VEGF no plasma desses pacientes. Contudo falta na literatura dados a cerca da frequência desses progenitores no sangue periférico e medula óssea de pacientes com anemia falciforme. Diante disso esse trabalho tem o objetivo de avaliar a frequência de progenitores no sangue periférico e medula óssea de pacientes com anemia falciforme e os possíveis mecanismos inflamatórios e angiogênicos envolvidos nesse processo.

Métodos

Pacientes

Os pacientes falciformes atendidos no ambulatório de ortopedia e traumatologia do COM-HUPES-UFBA foram selecionados para participação da pesquisa clínica intervencionista de acordo com normas estabelecidas para pesquisa clínica do país através da assinatura voluntária do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Maternidade Climério de Oliveira/ UFBA, de acordo com as exigências brasileiras para o desenvolvimento da pesquisa científica no país

(Parecer/resolução aditiva nº 086/2011). Os pacientes selecionados sob anestesia geral no Centro Cirúrgico foram submetidos à punção e aspiração na crista ilíaca. Cerca de 5ml de medula óssea foi coletado e foi procedido o protocolo de dosagem de citocinas e imunofenotipagem das células.

Citometria de Fluxo

As CPEs foram quantificadas no sangue periférico e na medula óssea utilizando a técnica de citometria de fluxo como descrito por Fadini et al (2008). Da medula óssea/sangue periférico total foi adicionado 1×10^6 células/tubo para realização das marcações. Para cada paciente foram separados 3 tubos para marcações, um para autofluorescência e dois tubos para as respectivas estratégias de marcações. As marcações dos controles isotipos utilizando anticorpos anti-IgG1 ligado a PE de camundongo (eBioscience, CA, USA), anti-IgG1 ligado a PerCP de camundongo (Becton Dickinson, CA, USA) e anti-IgG1 ligado a FITC de camundongo (BD Bioscience, NJ, USA) foram feitos apenas para os experimentos iniciais. Na primeira estratégia foram utilizados 10µl dos anticorpos anti-CD34-FitC (BD Bioscience, NJ, USA), anti CD45-PerCD (pan-marcador de leucócitos) (BD Bioscience, NJ, USA), e anti-KDR-PE (R&D System, Mineapolis, USA). Na segunda estratégia foram utilizados anticorpos 10µl dos anticorpos biotinizados anti-CD34-PerCP (Becton Dickinson, CA, USA) anti-CD133 – PE (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany), ambos marcadores de células-tronco, e anti-KDR (VEGFR2) – FitC (R&D System, Mineapolis, USA) marcador de células endoteliais. Todos os anticorpos foram utilizados na concentração descrita pelo fabricante. Da medula óssea/sangue periférico foi feita a contagem dos leucócitos totais utilizando 10µl de medula óssea/sangue periférico e 90µl de líquido de Turk. Em seguida foi procedida a contagem em câmara de Neubauer (Laboroptik, Germany). Após a contagem, 1×10^6 células foram centrifugadas a 2000rpm por 10 minutos à 4°C e imunofenotipadas utilizando 10µl dos anticorpos. As células foram incubadas a temperatura ambiente e ao abrigo da luz por 30 minutos, lavadas com CMF contendo 3% soro fetal bovino (Cultilab, Campinas, Brasil) e centrifugadas. Em seguida foi adicionado 1ml do tampão de lise (BD Bioscience, NJ, USA) e os tubos incubados por 10 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, as células foram lavadas, centrifugadas, ressuspendidas em 500µl da solução BSS/CMF contendo 3% soro de fetal bovino (Cultilab, Campinas, Brasil) e analisadas no citômetro de fluxo (FACScalibur, BD Bioscience, NJ, USA). Um total de até 500.000 eventos foi adquirido para cada tubo. Após a aquisição do citômetro os resultados obtidos foram expressos em percentual ou número de eventos totais encontrados no total de eventos

adquiridos. Para aquisição/análise dos resultados foi utilizado uma modificação do protocolo padronizado de contagem de células CD34+ pelo International Society of Hematotherapy Graft Engineering (ISAHAGE)

ELISA

Após a coleta do sangue periférico e da medula óssea, as amostras foram centrifugada a 2000 rpm por 10 minutos e o plasma separado foi armazenado a -20°C. Para a avaliação das citocinas inflamatórias (IL-8 e TNF), pró-angiogênicas (SDF-1 α , TGF-1 β e VEGF) foi realizado o imunoensaio enzimático (ELISA) conforme descrição do fabricante.

Análise Estatística

Os resultados de citometria de fluxo foram avaliados através do programa do citômetro de fluxo CellQuest (FACscalibur) e Summit (DAKO). As análises quantitativas foram avaliadas através do teste estatístico não paramétrico Mann-Whitney, utilizando o programa Prisma Graphpad versão 5.0. Os ensaios de migração, dosagem de citocinas, quantificação de progenitores, invasão e proliferação celular foram avaliados quanto a média/mediana e desvio padrão, utilizando o programa Excel ou Prisma Graphpad versão 5.0.

Resultados

Seleção dos pacientes

A relação dos pacientes falciformes e normais que participaram do estudo está descrita nas tabelas 1 e 2. Esta pesquisa teve a aprovação do comitê de ética em pesquisa da Maternidade Climério de Oliveira/ Universidade Federal da Bahia (Parecer/resolução Aditiva nº 086/2011). Os pacientes foram informados da pesquisa e após serem considerados aptos e concordarem em participar do estudo mediante a assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido foram incluídos na pesquisa. Cerca de 23 pacientes com anemia falciforme foram submetidos a coleta de sangue periférico (10 homens e 13 mulheres) com idades entre 18 e 55 anos (Tabela 2). Os pacientes apresentaram níveis reduzidos de hemoglobina (Hb) e um hematócrito (Ht) diminuído. Os níveis de plaquetas (PLT) apresentaram-se normais, contudo o reticulócitos se mostraram elevados entre os pacientes. Alguns pacientes apresentaram leucocitose e icterícia, como demonstrada pela contagem total de leucócitos (Leuco) e os níveis de bilirrubina total (BT) respectivamente. Cerca de 91% dos pacientes apresentaram outras co-morbidades, dos quais 71% deles relataram a presença de crises álgicas frequentes e

51% de seqüestro esplênico. Dos pacientes que participaram da pesquisa 22 deles faziam uso de ácido fólico e 8 faziam associação medicamentosa com medicamentos como: hidroxiuréia, analgésicos, anti-inflamatórios, anti-metabólicos, anti-reumáticos e anticonvulsivantes.

No período de vigência deste projeto, entre 2009 a 2011 cerca de 17 pacientes (10 pacientes com anemia falciforme e 7 pacientes HbA) foram submetidos ao procedimento de implante de células-tronco na região da osteonecrose (Tabela 3). Destes pacientes 12 do sexo masculino e 5 do sexo feminino, com idades entre 18 e 71 anos. Como descrito na tabela 2 os pacientes apresentaram dados hematológicos e bioquímicos normais. Cerca de 35% dos pacientes apresentaram osteonecrose bilateral e classificação de Ficat ente 2 e 3. Dos pacientes que participaram do estudo 10 deles faziam uso de ácido fólico e 10 associações medicamentosas com medicamentos como: hidroxiuréia, analgésicos, antiinflamatórios, anticoncepcionais, antidepressivos, anticonvulsivantes, antihipertensivos, antilipêmicos e diuréticos. Após o implante de células-tronco alguns pacientes relataram melhora da dor.

A medula óssea falciforme apresenta níveis elevados de células progenitoras endoteliais

Um total de 28 amostras de sangue periférico foram coletadas neste estudo (20 pacientes HbSS e 8 indivíduos normais), 10 amostras de medula óssea (7 pacientes falciformes e 3 pacientes HbA) e 12 amostras de sangue de cordão umbilical. Na tabela 4, 5 e 6 foram descritas a avaliação de todas as subpopulações encontradas no sangue periférico, na medula óssea e sangue de cordão umbilical.

Foi identificado um número maior de células $CD34^+/CD45^+$ no sangue periférico de pacientes falciformes comparado aos controles ($p < 0,05$) e no sangue de cordão umbilical (Figura 1A). De acordo com os resultados obtidos foi observada uma variação na frequência das subpopulações celulares investigadas. Segundo os resultados foi detectada uma frequência mais elevada de células $CD34^+/CD133^+$ no sangue periférico e na medula óssea de indivíduos controles quando comparados aos pacientes falciformes, contudo sem significância estatística ($p > 0,05$). No entanto foi observado diferenças significativas entre frequência de células $CD34^+/CD133^+$ no sangue falciforme quando comparada ao sangue de cordão umbilical ($p < 0,05$) (Figura 1B). Também foi identificado um discreto aumento das populações de células $CD34^+/KDR^+/CD133^+$ e $CD34^+/KDR^+/CD45^{low/-}$ nesses pacientes comparados aos controles normais, contudo sem significância estatística ($p > 0,05$) (Figura 1C e 1D). Na medula óssea foram identificadas frequências elevadas das células $CD34^+/KDR^+/CD45^{low/-}$ nos pacientes falciformes quando comparados aos pacientes controles, contudo sem

significância estatística como descrito na figura 1D ($p > 0,05$). Nenhuma diferença estatisticamente significativa foi encontrada na frequência das células CD34+/KDR+/CD133+ neste estudo (Figura 1C) ($p > 0,05$). Na medula óssea normal foi identificado um número maior de células CD34+/CD45+ comparado a medula falciforme, sem significância estatística (Figura 1A) ($p > 0,05$). Também foi detectado um número maior de células de todas as subpopulações investigadas na medula óssea normal e falciforme comparado a frequência no sangue de cordão umbilical.

Os pacientes falciformes apresentam um estado pró-angiogênico

Os níveis plasmáticos das citocinas TGF- β , VEGF, SDF-1 α e TNF do sangue periférico dos pacientes falciformes e indivíduos controles foram determinados através do ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay). Na determinação do TGF- β foram analisados um total de 49 amostras de plasma (36 pacientes HbSS e 13 pacientes HbA). Para a dosagem de VEGF foram analisadas 44 amostras de sangue periférico (31 HbSS pacientes e 13 indivíduos HbA). Na dosagem de SDF foram avaliadas 41 amostras de sangue periférico (30 pacientes HbA e 11 indivíduos HbA). Na determinação do TNF foram analisadas 39 amostras (28 pacientes HbSS e 11 pacientes HbA).

Na amostra de sangue periférico observou-se níveis mais elevados de TGF- β no plasma de indivíduos controles quando comparados aos pacientes falciformes, contudo sem significância estatística ($p > 0,05$) (Figura 2A). Neste estudo nenhuma diferença foi encontrada entre os níveis plasmáticos de TNF e VEGF de pacientes falciformes e indivíduos controles ($p > 0,05$) (Figura 2C, e 2D). De acordo com os resultados foram identificados níveis discretamente elevados de SDF-1 α tanto no plasma periférico de pacientes falciformes quando comparados aos controles, sem significância estatística ($p > 0,05$) (Figura 2B).

Discussão

A anemia falciforme é uma doença caracterizada por intensas crises vaso oclusivas, hemólise, danos em múltiplos órgãos e o estresse hematopoiético. Através da análise de citometria de fluxo foi possível identificar frequências elevadas de progenitores hematopoiéticos CD34+/CD45+ no sangue periférico de pacientes falciformes. Esses dados são coincidentes com estresse hematopoiético, relatado pelo aumento do número de BFU-E e eritroblastos no sangue periférico de pacientes com anemia falciforme (WU *et al* 2005; CROIZAT & NAGEL, 2007). O estresse hematopoiético parece ocorrer preferencialmente em pacientes

falciformes com elevada razão hemolítica, e o mecanismo proposto envolve o aumento da produção de fatores de crescimento de células-tronco (CSF) na medula óssea que irão estimular a produção de progenitores hematopoiéticos. Outras citocinas também podem participar sinergicamente com CSF, como IL-6, na expansão e mobilização de progenitores da medula óssea para o sangue periférico. De acordo com nossos resultados, não observamos diferenças significantes nos níveis das células $CD34^+/CD133^+/KDR^+$ e $CD34^+/KDR^+/CD45^{low/-}$ entre o sangue periférico dos pacientes falciformes quando comparados aos de indivíduos controle. Estes resultados corroboram e complementam os achados de BEEM *et al* (2009) que observaram elevação dos níveis de progenitores endoteliais circulantes apenas nos pacientes HbSC/ β -talassemia e HbSS/ β -talassemia em crise. A maior frequência dos níveis de EPC durante as crises poderia indicar o papel desta população na mobilização e re-endotelização de tecidos isquêmicos.

A população celular $CD34^+/CD133^+$ tem sido descrito na literatura como progenitores hemangioblásticos, comprometidos com linhagem sanguínea e endotelial, portanto, mais imaturos e anteriores à população de progenitores hematopoiéticos $CD34^+/CD45^+$ (GEHLING *et al*, 2000; TIMMERMANS *et al*, 20007). Nossos dados indicam uma redução nos níveis desta população no sangue periférico de pacientes com anemia falciforme. Embora haja uma discordância aparente nestes resultados, os dados recentes da literatura demonstram que as células $CD34^+/CD133^+/KDR^+$ representariam uma população de progenitores hematopoiéticos primitivos que expressam CD45 (CASE *et al.*, 2007). De forma similar TIMMERMAN *et al* (2007) observaram que as CPEs não são derivadas de células $CD133^+$, sugerindo que essa população representaria progenitores de origem hematopoiética com atividade pró-angiogênica parácrina. GRISAR *et al* (2005) observaram um número reduzido dessa população no sangue periférico de pacientes com Artrite Reumatóide. Em pacientes com microvasculopatia após alotransplante, foi identificado, de maneira semelhante, um reduzido número desses progenitores no sangue periférico dos pacientes (OSTO *et al*, 2010). Nossos resultados também estão em concordância com aqueles encontrados por MOONEN *et al* (2007), em que os autores observaram uma frequência reduzida de células $CD34^+/CD133^+$ circulantes em pacientes com Lupus Eritematoso Sistêmico (LES), uma doença auto-imune em que ocorre estresse hematopoiético e tardiamente, desgaste da medula óssea. Embora o número reduzido dos níveis da população $CD34^+/CD133^+$ tenha sido descrita em doenças inflamatórias crônicas como LES e Artrite Reumatóide, nosso trabalho é o primeiro relato da frequência

dessa população celular no sangue periférico em pacientes com anemia falciforme assintomáticos.

Devido aos eventos de vaso-oclusão recorrentes e recidivantes, a doença falciforme é caracterizada por micro-lesões na medula óssea que podem conduzir a necrose tecidual (KERACHIAN *et al*, 2006). O infarto tecidual frequentemente conduz à isquemia/hipóxia tecidual, e à ativação dos mecanismos de reparo, com secreção de fatores angiogênicos e mobilização/ativação de progenitores endoteliais que estimulem a angiogênese (SEGERS & LEE, 2008). Embora, estes mecanismos fisiopatológicos estejam bem descritos para diversos tecidos periféricos, supõe-se que o mesmo ocorra no infarto da medula óssea, o que levaria a um aumento na produção de CPEs na medula óssea.

Nossos resultados de dosagem da população $CD34^+/KDR^+/CD45^{low/-}$ indicam uma alta frequência desses progenitores na medula óssea de pacientes com anemia falciforme. Na literatura essas populações celulares tem sido frequentemente correlacionadas a putativos progenitores endoteliais. Embora LUCK *et al* (2004) tenha observado níveis aumentados de células $CD34^+$ na medula óssea e sangue periférico de pacientes falciformes, o que é sugestivo de estresse hematopoiético, nenhuma inferência foi feita quanto à população de progenitores $CD34^+/CD133^+/KDR^+$ neste grupo de pacientes. Em pacientes transplantados foi encontrada a frequência reduzida dessa população celular (2 células/ 1×10^6 eventos) quando comparado com os indivíduos normais (8-10 células/ 10×10^6 eventos) (OSTO *et al*, 2010). De forma semelhante pacientes com antrite reumatóide apresentaram níveis circulantes diminuídos desses progenitores quando comparado ao controle ($0,048 \pm 0,02\%$ vs $0,07 \pm 0,01\%$). Na medula óssea essa população apresenta uma frequência baixa, menor que 1 célula/ml (TURA *et al*, 2007).

As CPEs circulantes $CD34^+/KDR^+/CD45^{low/-}$ tem sido descritas em diversas condições patológicas. Os níveis de CPEs circulantes foram monitorados em pacientes com carcinoma renal tratados com inibidores de tirosino kinases por 14 dias. Eles observaram que houve mudanças significativas dessa população após 14 dias (0,5% -1.7% do sangue total) (FERACE *et al*, 2011). Em pacientes com disfunção ventricular essa frequência foi 0,002 a 0,005% da fração de leucócitos circulantes (BOILSON *et al*, 2010). Estudos com pacientes com diabetes melitus tipo 2 a frequência dessa população foi significativamente menor que nos controles (1053 ± 101 células/ml vs 1649 ± 105 células/ml) (LIAO *et al*, 2010). Coincidentemente em pacientes com osteonecrose foi identificado níveis reduzido das CPEs

CD34⁺/KDR⁺/CD45^{low/-} circulantes quando comparado aos controles (545 ± 177 células/ml vs 1460 ± 265 células/ml). De acordo com esses resultados o reduzido número de CPEs circulantes nestes pacientes estaria relacionado com fator risco elevado para o desenvolvimento da necrose óssea (FENG *et al*, 2010). Em pacientes falciformes HbSC/ β -talassemia e HbSS/ β -talassemia assintomáticos BEEM *et al* (2009) não identificaram essa população celular (0 - 0 células/ml), no entanto em pacientes em crise vaso-oclusiva a frequência das CPEs circulantes aumentaram significativamente (0 - 186 células/ml). Na medula óssea tem sido identificado diferentes populações celulares com potencial angiogênico. Contudo TIMMERMANS *et al* (2007) através de seleção magnética utilizando microbeads de CD34 observaram que apenas as células CD34⁺/CD45^{low/-} foram capazes de formar colônias de células endoteliais. Esses progenitores foram capazes de formar cerca de 8 colônias/ 8×10^3 células em média, enquanto as células CD133⁺ e CD34⁺/CD45^{low} faltaram essa característica.

Trabalhos recentes sugerem que a população celular com fenótipo CD34⁺/CD45^{low/-} contenha maior frequência de células progenitoras endoteliais (CASE *et al*, 2007, TIMMERMANS *et al*, 2007). Nossos resultados são concordantes com estes achados, pois se baseiam em análise da população CD34⁺/KDR⁺/CD45^{low/-} que está contida no fenótipo mais abrangente CD34⁺/CD45^{low/-}. No entanto, a descrição e o papel de uma célula progenitora endotelial não deve fundamentar-se apenas na análise de marcadores fenotípicos, mas também deve contemplar a caracterização biológica (celular, molecular e funcional) desta população. Essas células precisam ser avaliadas quanto à sua capacidade de formar colônias *in vitro*, possuir marcadores de células endoteliais e serem capazes de promover a vasculogênese *in vivo* (SIEVEKING *et al*, 2008).

A anemia falciforme é uma doença que apresenta um estado inflamatório crônico (MAKIS *et al*, 2000). Embora os valores medianos de TGF- β e VEGF estejam mais reduzidos que os valores dos controles, é possível observar que um número maior de pacientes apresentaram níveis elevados dessas citocinas. Esses resultados são concordantes com os dados obtidos por CROIZAT & NAGEL *et al* (1999). Eles observaram níveis mais elevados de TGF- β no plasma de pacientes com anemia falciforme com concomitantes níveis aumentados de HbF, do que no plasma dos pacientes com níveis mais reduzidos de HbF ou mesmo os indivíduos controle. Neste trabalho, observou-se que o nível elevado de TGF- β concomitante ao HbF elevado estaria relacionada às baixas concentrações plasmáticas CSF, sugerindo que o TGF- β é um regulador negativo de CSF e portanto, atuaria reprimindo a expressão de c-Kit nas células progenitoras hematopoiéticas. Por outro lado, em pacientes com baixos níveis de HbF,

o TGF- β pareceria agir sinergicamente com GM-CSF participando da amplificação da resposta BFU-E ao CSF, estimulando dessa forma o estresse eritropoiético. Desta forma, teríamos a citocina TGF- β atuando como um regulador bimodal e fator complicador da hematopoiese em pacientes com anemia falciforme. De acordo com CERQUEIRA *et al* (2011) o valor médio encontrado de HbF entre os pacientes anemia falciforme estáveis da Bahia foi de 7%. Considerando-se estes dados e o papel do TGF- β , o estresse hematopoiético encontrado em nosso trabalho, representado pela frequência elevada de células CD34⁺/CD45⁺, poderia estar relacionada também ao efeito modulador positivo do TGF- β nesta população.

Os níveis de VEGF foram encontrados elevados nos pacientes falciformes neste trabalho e esses resultados corroboram com dados encontrados por BEEM *et al* (2009). Eles detectaram níveis aumentados de VEGF em pacientes falciformes que aumentaram em pacientes em crise. O VEGF é uma importante citocina angiogênica que está relacionada com a produção, mobilização, proliferação e diferenciação de CPEs. Em nosso trabalho, os níveis aumentados dessa citocina estariam relacionados com o aumento desses progenitores (células CD34⁺/CD133⁺/KDR⁺ e CD34⁺/KDR⁺/CD45^{low/-}) na medula óssea dos pacientes falciformes. As sucessivas crises vaso-oclusivas, danos endoteliais e necrose medular podem estimular a neovascularização conduzindo ao estado pró-angiogênico desses pacientes e consequentemente ao aumento de CPEs. Embora os níveis de VEGF tenham sido encontrados elevados neste trabalho, níveis plasmáticos de SDF-1 α não apresentaram diferenças entre pacientes falciformes e os indivíduos controle. Esses resultados contrastam com dados encontrados por LANDBURG *et al* (2009) que identificaram níveis circulantes elevados de SDF-1 α em pacientes HbS/ β -talassemia do indivíduos controles. JIN *et al* (2007) propôs que o SDF-1 α tem um papel essencial na retenção e mobilização de progenitores da medula óssea para o sangue periférico (JIN *et al*, 2007). Para que ocorra a migração celular, deve haver uma diferença no gradiente de concentração, para que as células progenitoras possam migrar em direção ao gradiente de SDF-1 (JIN *et al*, 2007). Assim, possivelmente, os níveis elevados de CPEs encontrados na medula óssea falciforme podem estar relacionado aos baixos níveis plasmáticos de SDF-1 α , o que favoreceria a retenção desses progenitores na medula óssea.

Nosso estudo também não observou diferenças significativas nos níveis de TNF entre pacientes falciformes e controle. Contrariamente aos nossos resultados LANARO *et al* (2009) observaram níveis entre 3,0 pg/ml de TNF em pacientes com anemia falciforme em estado estável, enquanto que os controles apresentaram níveis entre 1,5 pg/ml dessa citocina,

sugerindo um estado pró-angiogênico dos pacientes. No entanto CAJADO *et al* (2011) reportou níveis entre $29,711 \pm 19,49$ pg/ml dessa citocina em crianças com anemia falciforme estáveis no estado da Bahia. Em nosso trabalho não observamos diferenças significativas entre os níveis plasmáticos de TNF nos pacientes falciformes e controles que apresetaram valores entre 80pg/ml dessa citocina. Esses dados estão coerentes com os níveis aumentados de TGF- β . O TGF- β é uma citocina imunoregulatória e pode agir reduzindo a resposta inflamatória modulando os níveis de TNF. O TNF é uma importante citocina pró-inflamatória que age aumentando a resposta inflamatória, induzindo a cascata de coagulação, estimulando a produção de proteínas de fase aguda e levando a ativação endotelial.

A Anemia falciforme é uma doença que apresenta uma miríade de complicações fisiopatológicas entre elas, uma intensa hemólise, estresse hematopoético, vasculopatia, e danos teciduais. Os pacientes que participaram deste estudo são pacientes com anemia falciforme, que apresetaram osteonecrose, em estado estável e que foram submetidos ao transplante autólogo de células mononucleares da medula óssea. Concluimos que a maior frequência CPEs representa uma marca biológica dos pacientes com anemia falciforme, uma vez que o número elevado de células progenitoras faz parte do estresse hematopoiético dessa categoria de pacientes.

Agradecimentos

Ao Laboratório de Imunologia (LABIMUNO) do Instituto de Ciências da Saúde (ICS) e ao Laboratório de Bioengenharia Tecidual e Biomateriais da Universidade Federal da Bahia (UFBA) e, ao Serviço de Hemetologia e Ortopedia e Traumatologia do Complexo Hospitalar Universitário Professor Edgar Santos da UFBA.

Referências

ASAHARA, Takayuki; MUROKARA, Toyoaki; SULLIVAN, Alison; SILVER, Marcy; ZEE, Rie Van Der; LI, Tong; WITZENBICHLER, Bernhard; SCHATTEMAN, Gina; ISNER, Jeffrey M. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. **Science**, 275: 964-967, 1997.

BEEM, Rachel T. Van; NUR, Erfan; ZWAGINGA, Jaap Jan; LANDBURG, Precious P.; BEER, Eduard J. Van; DUITTS, Ashley; BRANDJES, Dees P.; LOMMERSE, Ingrid; BOER, Hetty C. De; SCHOOT, Ellen Van Der; SCHNOG, John-John B.; BIEMOND, Bart J.

Elevated endothelial progenitor cells during painful sickle cell crisis. **Experimental Hematology**, 37:1054–1059, 2009.

BEYTH, Shaul; SCHROEDER, Josh; LIBERGALL, Meir. Stem cells in bone diseases: current clinical practice. **British Medical Bulletin** 99: 199–210, 2011.

BOILSON, B. A.; LARSEN, K.; HARBUZARIU, A.; DELACROIX, S.; KORINEK, J.; FROEHLICH, H.; BAILEY, K. R.; SCOTT, C. G.; SHAPIRO, B. P.; BOERRIGTER, G.; CHEN, H. H.; REDFIELD, M. M.; BURNETT, J. C.; SIMARI, R. D. Regulation of circulating progenitor cells in left ventricular dysfunction. **Circ. Heart Fail**, 3: 635-642, 2010.

CAJADO, C.; CERQUEIRA, B. A. V.; COUTO, F. D.; MOURA-NETO, J. P.; VILAS-BOAS, W.; DOREA, M. J.; LYRA, I. M.; BARBOSA, C. G.; REIS, M. G.; GONÇALVES, M. S. TNF-alpha and IL-8: Serum levels and gene polymorphisms (_308G>A and _251A>T) are associated with classical biomarkers and medical history in children with sickle cell anemia. **Cytokine**, 2011.

CASE, Jamie; MEAD, Laura E.; BESSLER, Waylan K.; PRATER, Daniel; WHITE, Hilary A.; SAADATZADEH, M. R.; BHAVSAR, Janak R.; YODER, Mervin C.; HANELINE, Laura S.; INGRAM, David A. Human CD34⁺AC133⁺VEGFR2⁺ cells are not cells endothelial progenitor cells but distinct, primitive hematopoietic progenitors. **Experimental Hematology**, 35: 1109-1118, 2007.

CROIZAT, Helena; NAGEL, Ronald L. Circulating cytokines response and the levels of erythropoiesis in sickle cell anemia. **American Journal of Hematology**, 60:105-115, 1999.

DALTRO, Gildásio Cerqueira; FORTUNA, Vitor Antonio; ARAÚJO, Marco Aurélio Salvino; LESSA, Paulo Itamar Ferraz; SOBRINHO, Uirassú de Assis; BOROJEVIC, Radovan. Femoral Head necrosis treatment with autologous stem cell in sickle cell disease. **Acta Ortop. Bras.**, 16 (1): 23-27, 2008.

FADINI, Gian Paolo; BAESSO, ILENIA; ALBIERO, Mattia; SARTORE, Saverio; AGOSTINI, Carlo; AVOGARRO, Angelo. Technical notes endothelial progenitor cells: Ways to escape from the knowledge plateau. **Atherosclerosis**, 197: 496-503, 2008.

FENG, Yong; YANG, Shu-Hua; XIAO, Bao-Jun; XU, Wei-Hua; YE, Shu-Nan; XIA, Tian; ZHENG, Dong; LIU, Xian-Zhe; LIAO, Yun-Fei. Decreased in the number and function of

circulation endothelial progenitor cells in patients with avascular necrosis of the femoral head. **Bone**, 46: 32-40, 2010.

FARACE, F.; GROSS-GOLPIL, M.; TOURNAY, E.; TAYLOR, M.; VIMOND, N.; JACQUES, N.; BILLIOT, F.; MAUGUEN, A.; HILL, C.; ESCUDIER, B. Levels of circulating of CD45^{dim}CD34⁺VEGFR2⁺ progenitor cells correlate with outcome in metastatic renal cells carcinoma patienttreated with tyrosine kinase inhibitors. **British Journal of Cancer**, 14: 1144-1150, 2011.

GANGJI, Valérie; HAUZEUR, Jean-Philippe. Treating osteonecrosis with autologous bone marrow cells. **Skeletal Radiol.**, 39: 209-211, 2010.

GEHLING, U. M.; ÈRGUN, S.; SCHUMACHER, U.; WAGENER, C.; PANTEL, K.; OTTE, M.; SCHUCH, G.; SCHAFHAUSEN, P.; MENDE, T.; KILIC, N.; KLUGE, K.; SCHÄFER, B.; HOSSFELD, D. K.; FIEDLER, W. In vitro differentiation of endothelial cells from AC133-positive progenitor cells. **Blood**, 95(10): 3106-12, 2000.

GRISAR, Johannes; ALETAHA, Daniel; STEINER, Carl W.; KAPRAL, Theresa; STEINER, Sabine; SEIDINGER, Daniela; WEIGEL, Günter; SCHWARZINGER, Ilse; WOLOZCSZUK, Wolfgang; STEINER, Günter; SMOLEN, Josef S. Depletion of Endothelial Progenitor Cells in the Peripheral Blood of Patients With Rheumatoid Arthritis **Circulation**. 111:204-211, 2005.

HERNIGOU, Phillipe; BEAUJEAN, Françoise. Abnormalities in the Bone Marrow of the Iliac Crest in Patients Who Have Osteonecrosis Secondary to Corticosteroid Therapy or Alcohol abuse. **J Bone Joint Surg Am.**, 79:1047-53, 1997.

HERNIGOU, Phillipe; BEAUJEAN, Françoise. Treatment of osteonecrosis with autologous bone marrow grafting. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, 405: 14-23, 2002.

HERNIGOU, Phillipe; DALTRO, Gildásio Cerqueira; FILIPINI, Paolo; MUKISI-MUKASA, Martin; MANICOM, Olivier. Percutaneous Implantation of Autologous Bone Marrow Osteoprogenitor Cells as Treatment of Bone Avascular Necrosis Related to Sickle Cell Disease **The Open Orthopaedics Journal**, 2: 62-65, 2008.

HRISTOV, Mihail; ERL, Wolfgang; WEBER, Peter C. Endothelial Progenitor Cells: Mobilização, Differentiation and Homing. **Arterioscler Thromb Vasc Biol.**, 23:1185-1189, 2003.

JONES, Kevin B.; SESHADRI, Tara; KRANTZ, Roselynn; KEATING, Armand; FERGUSON, Perte C. Cell-Based Therapies for Osteonecrosis of the Femoral Head. **Biol Blood Marrow Transplant**, 14: 1081-1087, 2008.

JIN, F.; ZHAI, Q.; QIU, L.; MENG, H.; ZOU, D.; WANG, Y.; LI, Q.; YU, Z.; HAN, J.; LI, Q. Degradation of BM SDF-1 by MMP9: the role in G-CSF-induced hematopoietic stem/progenitor cell mobilization. **Bone Marrow Transplantation**, 1-8, 2008.

KARATOPRAK, Omer; KORKMAZ, Mehmet Fatih; KARA, Ayhan Nedim; GOGUS, Abdullah; ISIKLAR, Zekeriya Ugur. Early results of autologous mononuclear bone marrow cell transplantation in nontraumatic avascular necrosis of the femoral head. **Acta Orthop Traumatol Turc**, 42(3):178-18, 2008.

KERACHIAN, Mohammad Amin; HARVEY, Edward J.; COURNOYER, Denis; CHOW, Terry Y. K.; SÉGUIN, Shantal. Avascular Necrosis of the Femoral Head: Vascular Hypotheses. **Endothelium**, 13:237–244, 2006.

LANARO, C.; FRANCO-PENTEADO, C. F.; ALBUQUEQUE, D. M.; SAAD, S. T. O.; CONRAN, N.; COSTA, F. F. Altered levels of cytokines and inflammatory mediators in plasma and leukocytes of sickle cell anemia patients and effects of hydroxyurea therapy. **J. Leukoc. Biol.** 85: 235–242; 2009.

LANDBURG, P. P.; NUR, E.; MARIA, N.; BRANDJES, D. P.; BIEMOND, B. J.; SCHNOG, J. B.; DUIJS, A. J.; Elevated circulating stromal-derived factor-1 levels in sickle cell disease. **Acta Haematol.** 122(1): 64-9, 2009.

LIAO, Y. F.; CHEN, L. L.; ZENG, T. S.; LI, Y. M.; YU, F.; HU, L. J.; YUE, L. Number of circulating endothelial progenitor cells as a marker of vascular endothelial function for type 2 diabetes. **Vascular Medicine**, 15(4): 279-285, 2010.

LIN, Yi; WEISDORF, Daniel J.; SOLOVEY, Anna; HEBBEL, Robert P. Origins of circulating endothelial cells and endothelial outgrowth from blood. **The Journal of Clinical Investigation**, 105(1): 71-77, 2000.

LUCK, L.; ZENG, L.; HITI, A. L.; WEINBERG, A. L.; MALIK, P. Human CD34(+) and CD34(+)CD38(-) hematopoietic progenitors in sickle cell disease differ phenotypically and functionally from normal and suggest distinct subpopulations that generate F cells. **Experimental Hematology**, 32(5): 483-93, 2004.

MAHADEO, K. M.; OYEKU, S.; TARAGIN, B.; RAJPATHAK, S. N.; MOODY, K.; SANTIZO R.; DRISCOLL, M. C. Increased prevalence of osteonecrosis of the femoral head in children and adolescents with sickle-cell disease. **American Journal Hematology**, 86(9): 806-8, 2011.

MALIZOS, Konstatinos N.; KARANTANAS, Apostolos H.; VARITIMIDIS, Sokratis E.; DAILIANA, Zoe H.; BARGIOTAS, Konstatinos; MARIS, Thomas. Osteonecrosis of femoral head: Etiology, imaging and treatment. **European Journal of Radiology**, 63: 16-28, 2007.

MAKIS, A. C. ; HATZIMICHAEL, E. C. ; BOURANTAS, K. L. The role of cytokines in sickle cell disease. **Ann. Hematol.**, 79: 407-413, 2000.

MOONEN, Jan Renier AJ; LEEUW, Karina De; SEIJEN, Xavier J Gallego Y Van; KALLENBERG, Cees G. M.; LUYN, Marja J. A. Van; BIJL, Marc; HARMSEN, Martin C. Reduced number and impaired function of circulating progenitor cells in patients with systemic lupus erythematosus. **Arthritis Research & Therapy**, 9: 84, 2007.

MUKISI-MUKASA, Martin; GOMEZ-BROUCHET, Anne; DONKERWOLCKE, Monique; HINSENKAMP, Maurice; BURNY, Franz. Histopathology of aseptic necrosis of the femoral head in sickle cell disease. **International Orthopaedic**, 2010.thy

OSTO, Helena, CASTELLANI, Chiara; FADINI, Gian Paolo; BAESSO, Ilenia; GAMBINO, Antonio; AGOSTINI, Carlo; AVOGARO, Angelo; GEROSA, Gino; THIENE, Gaetano; ILICETO, Sabino; ANGELINI, Annalisa; TONA, Francesco. Impaired endothelial progenitor cell recruitment may contribute to heart transplant microvasculopathy. **The Journal of Heart and Lung Transplantation**, 2010.

REES, David C.; WILLIAMS, Thomas N.; GLADWIN, Mark T. Sickle-Cell Disease. **Lancet**, 376: 2018-31, 2010.

RIBATTI, D. The discovery of endothelial progenitor cells. An historical review. **Leuk. Res.** 31(4): 339-44, 2007.

SIEVEKING, Daniel P. ; BUCKLE, Andrew; CELERMAJER, David S. ; NG, Martin K. C. Strikingly different angiogenic properties of endothelial progenitor cell subpopulations: Insights from a novel human angiogenesis assay. **Journal of American College of Cardiology**, 51 (6): 660-668, 2008

TIMMERMANS, Frank; HAUWERMEIREN, Filip Van; DE SMEDT, Magda; RAEDT, Robrecht; PLASSCHAERT, Frank; DE BUYZERE, Marc L.; GILLEBERT, Thierry C.; PLUM, Jean; VANDEKERCKHOVE, Bart. Endothelial Outgrowth Cells Are Not Derived From CD133⁺ Cells or CD45⁺ Hematopoietic Precursors. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, 27: 1572-1579, 2007.

WATT, Suzanne M.; ATHANASSOPOULOS, Athanasios; HARRIS, Adrian L.; TSAKNAKIS, Grigorios. Human endothelial stem/progenitor cells, angiogenic factor and vascular repair. **Journal of The Royal Society**, 2010.

WU, Catherine J.; KRISHNAMURTI, Lakshamanan; KUTOK, Jeffery L. BIERNACKI, Melinda; ROGERS, Shelby; ZHANG, Wandi; ANTIN, Joseph H.; RITZ, Jerome. Evidence for ineffective erythropoiesis in severe sickle cell disease, **Blood**, 106(10): 3639-3645, 2005.

YODER, Marvin C. ; MEAD, Laura E. ; PRATER, Daniel; KRIER, Thereza R. ; MROUEH, Karim N. ; LI, Fang; KRASICH, Rachel; TEMM, Constance J. ; PRCHAL, Josef T. ; INGRAM, David A. Redefining endothelial progenitor cells via clonal analysis and hematopoietic stem/progenitor cell principals. **Blood**, 109 (5): 1801-1809, 2007.

ZAGO, Marco Antônio; PINTO, Ana Cristina. The Pathophysiology of sickle cell disease: from the genetic mutation to multiorgan dysfunction. **Rev. Bras. Hematol. Hemot.**, 29 (3): 207-214, 2007.

LEGENDAS DAS TABELAS

Tabela 1. Relação dos dados hematológicos, bioquímicos e histórico clínico dos pacientes com anemia falciforme que foram submetidos a coleta de sangue periférico.

Tabela 2. Relação dos dados hematológicos, bioquímicos e evolução do quadro clínico dos pacientes com anemias falciformes e normais que foram submetidos ao implante de CMMOs.

* ON= Osteonecrose, ** HU= Hidroxiuréia.

Tabela 3. Frequência das subpopulações de células CD34⁺/CD45⁺, CD34⁺/CD133⁺, CD34⁺/KDR⁺/CD133⁺ e CD34⁺/KDR⁺/CD45^{low/-}. Encontradas no sangue periférico de pacientes com anemia falciforme e indivíduos normais.

Tabela 4 Frequência das subpopulações de células CD34⁺/CD45⁺, CD34⁺/CD133⁺, CD34⁺/KDR⁺/CD133⁺ e CD34⁺/KDR⁺/CD45^{low/-}, encontradas na medula óssea de pacientes com anemia falciforme.

Tabela 5. Frequência das subpopulações de células CD34⁺/CD45⁺, CD34⁺/CD133⁺, CD34⁺/KDR⁺/CD133⁺ e CD34⁺/KDR⁺/CD45^{low/-}, encontradas no sangue de cordão umbilical de indivíduos normais.

LEGENDAS DA FIGURAS

Figura 1. Frequência das subpopulações de células CD34⁺/CD45⁺ (A), CD34⁺/CD133⁺ (B), CD34⁺/KDR⁺/CD133⁺ (C), CD34⁺/KDR⁺/CD45^{low/-} (D), encontradas no sangue periférico, medula óssea de pacientes falciformes e no sangue de cordão umbilical de indivíduos normais. A barra erros representa a mediana dos valores obtidos (Mann-Whitney).

Figura 2. Dosagem de TGF- β (A), e TNF (B), SDF-1 α (C) e VEGF (D), no sangue periférico e medula óssea de pacientes falciformes e indivíduos normais por ELISA. A barra de erros representa a mediana dos valores obtidos (Mann-Whitney).

Frequência das subpopulações celulares encontradas no Sangue Periférico de pacientes normais e falciformes						
Paciente	Genótipo	Leuco X10 ³	Subpopulações celulares			
			CD34 ⁺ /45 ⁺	CD34 ⁺ /CD133 ⁺	CD34 ⁺ /CD133 ⁺ /KDR ⁺	CD34 ⁺ /CD133 ⁺ /45 ^{low/-}
1	HbSS	11	1155	32	86	250
2	HbSS	7	613	0	0	51
3	HbSS	6,3	504	1078	883	207
4	HbSS	6,6	462	356	132	185
5	HbSS	17	3096	986	408	633
6	HbSS	11	2354	68	92	47
7	HbSS	11	2091	63	63	121
8	HbSS	11	2816	839	60	968
9	HbSS	8,2	628	0	0	0
10	HbSS	10	220	0	0	60
11	HbSS	6,3	567	0	0	0
12	HbSS	9,6	1071	38	19	77
13	HbS	13	4218	0	26	130
14	HbSS	12	617	696	396	48
15	HbSS	5	136	68	181	18
16	HbSS	7,6	152	149	250	0
17	HbSS	14	502	310	1359	67
18	HbSS	17	NF*	2304	353	NF*
19	HbSS	16	NF*	4437	4522	NF*
20	HbSS	17	1323	333	247	41
21	HbA	8	347	0	0	32
22	HbA	6,8	694	538	0	150
23	HbA	9,7	246	982	35	214
24	HbA	6,7	54	195	120	24
25	HbA	5	39	875	70	59
26	HbA	7	157	356	276	29
27	HbA	7	70	660	1078	0
28	HbA	7,4	NF*	0	17	NF*

*NF= Não foi feito a avaliação dessa subpopulação celular

Frequência das subpopulações celulares encontradas na medula óssea de pacientes falciformes

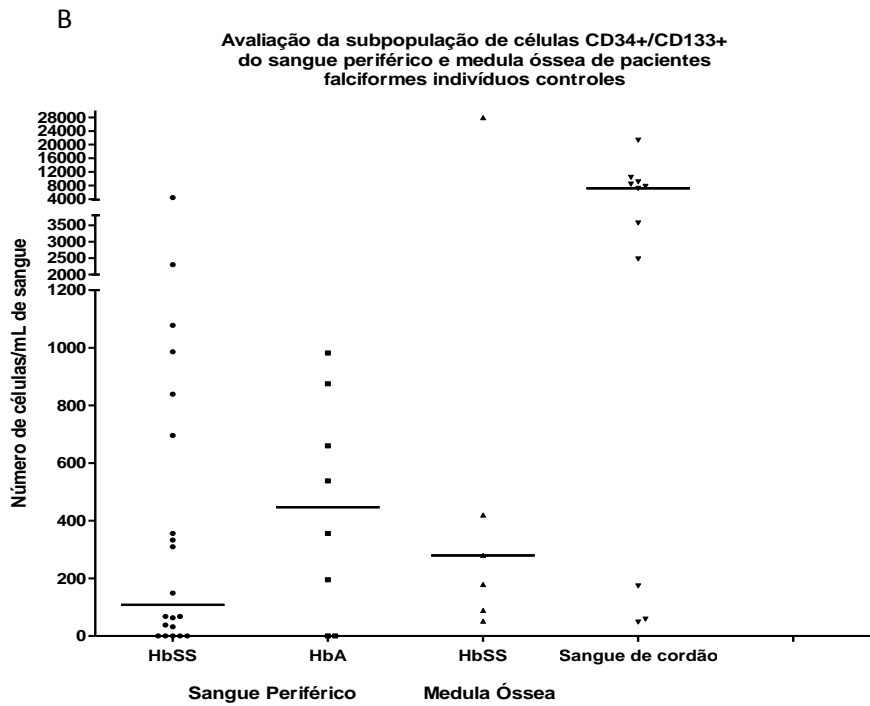
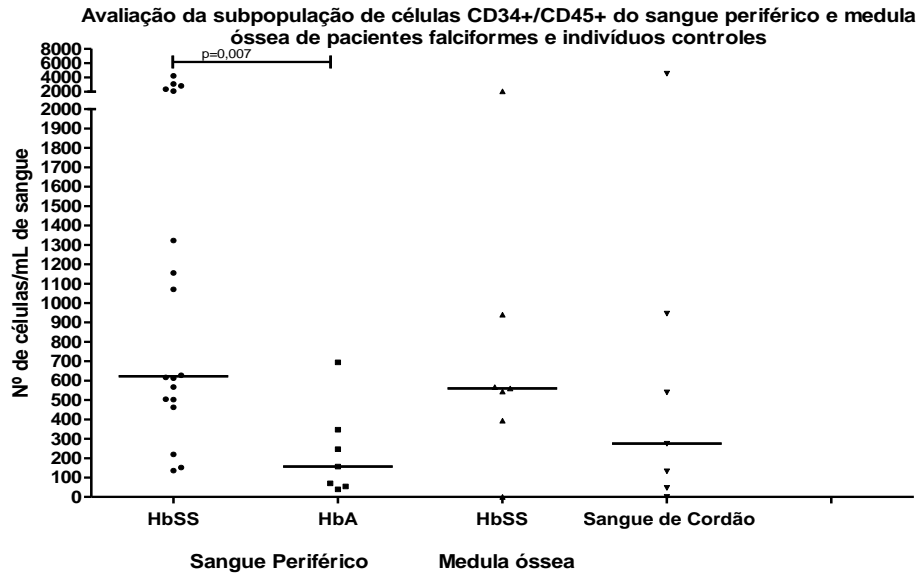
Paciente	Genótipo	Leuco X10 ³	Subpopulações celulares			
			CD34 ⁺ /45 ⁺	CD34 ⁺ /CD133 ⁺	CD34 ⁺ /CD133 ⁺ /KDR ⁺	CD34 ⁺ /CD133 ⁺ /45 ^{low/-}
1	HbSS	17	940	27967	74	0
2	HbSS	13	0	52	0	0
3	HbSS	30	394	179	1617	5041
4	HbSS	20	2066	89	1336	82
5	HbSS	16	544	420	804	301
6	HbSS	20	567	1546	823	385
7	HbSS	70	560	280	560	1680
8	HbSS	26	76	958	779	152
9	HbSS	14	4726	489	164	225
10	HbSS	17	940	NF*	NF*	9

*NF= Não foi feito a avaliação dessa subpopulação celular

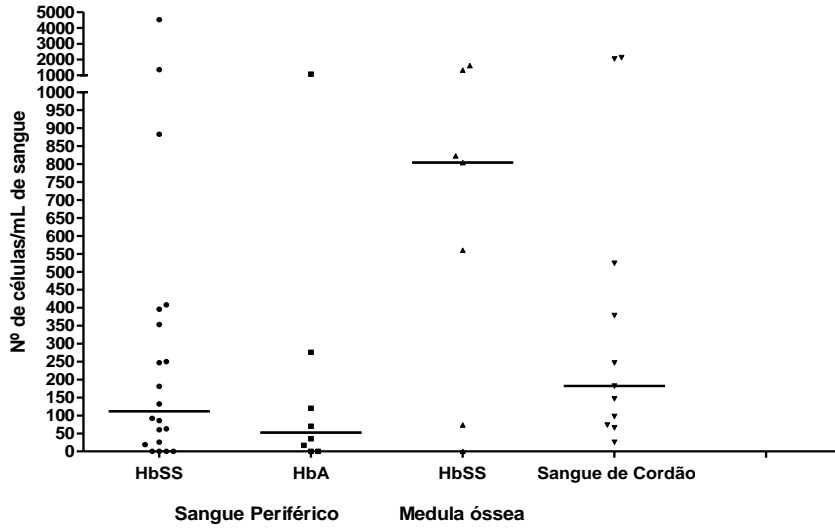
Frequência das subpopulações celulares encontradas no Sangue de Cordão Umbilical de Indivíduos Normais

Paciente	Genótipo	Leuco X10 ³	Subpopulações celulares			
			CD34 ⁺ /45 ⁺	CD34 ⁺ /CD133 ⁺	CD34 ⁺ /CD133 ⁺ /KDR ⁺	CD34 ⁺ /CD133 ⁺ /45 ^{low/-}
1	HbA	11	946	2480	66	0
2	HbA	13	47	8450	26	0
3	HbA	10	133	7190	2133	33
4	HbA	12	0	7800	2046	24
5	HbA	9,3	275	174	74	215
6	HbA	6,7	540	59	147	19
7	HbA	10	4550	49	98	0
8	HbA	8,3	NF*	9099	182	NF*
9	HbA	12	NF*	3573	247	NF*
10	HbA	21	NF*	21367	524	NF*
11	HbA	16	NF*	10414	379	NF*

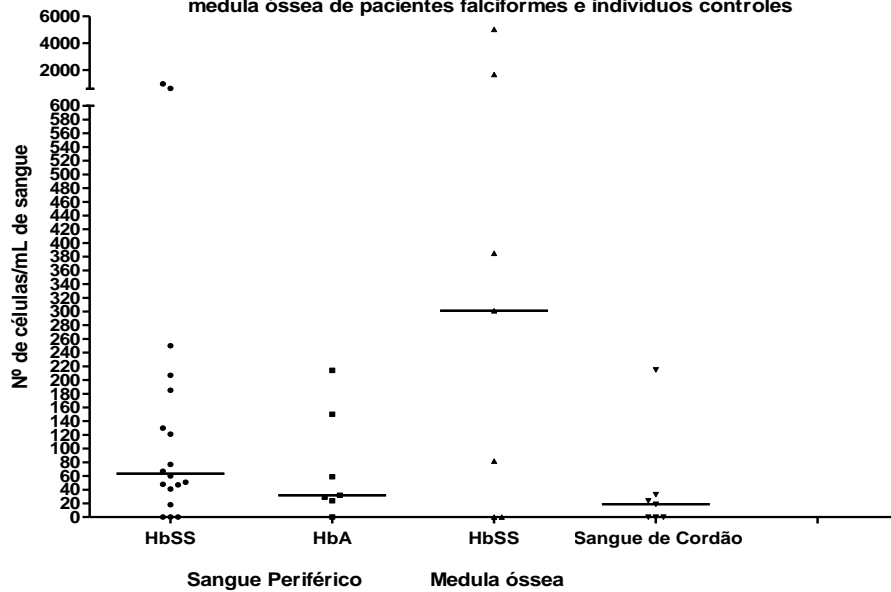
*NF= Não foi feito a avaliação dessa subpopulação celular



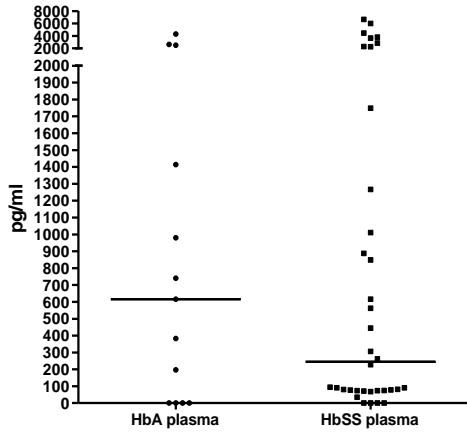
C Avaliação da subpopulação de células CD34+/KDR+/CD133 do sangue periférico e medula óssea de pacientes falciformes e indivíduos controles



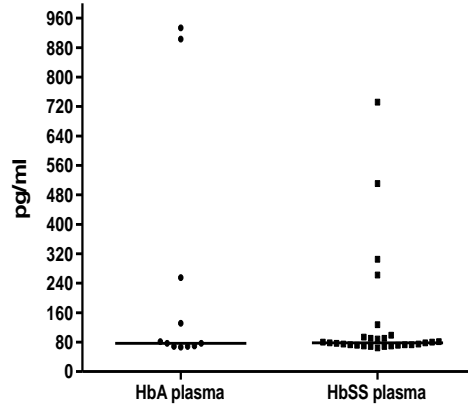
D Avaliação da subpopulação de células CD34+/KDR+/CD45low/- do sangue periférico e medula óssea de pacientes falciformes e indivíduos controles



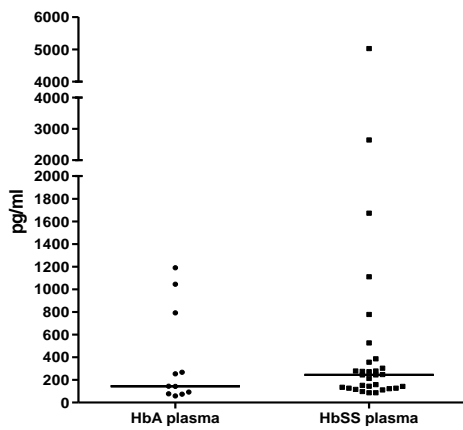
A Avaliação dos níveis plasmáticos periférico de TGF- β de pacientes falciformes e indivíduos controles



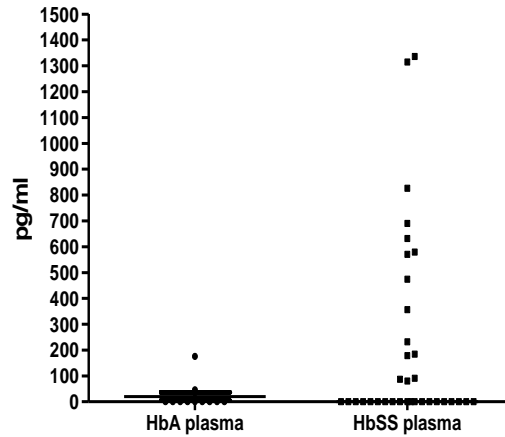
B Avaliação dos níveis plasmáticos periférico de TNF de pacientes falciformes e indivíduos controles



C Avaliação dos níveis plasmáticos periférico de SDF-1 α de pacientes falciformes e indivíduos controles



D Avaliação dos níveis plasmáticos periférico de VEGF de pacientes falciformes e indivíduos controles



TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Aspectos Imunobiológicos da Células Progenitoras Endoteliais na Anemia Falciforme.

Procedimento: Coleta de aspirado/ biópsia de medula óssea

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO PACIENTE OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. Nome do Paciente: _____

2. Documento de Identidade: _____

3. Sexo: (M) (F) Data Nascimento: _____

4. Endereço: _____

Bairro: _____ Cidade: _____ Estado: _____

CEP: _____ Telefone: _____

5. Responsável legal: _____

Natureza (grau de parentesco, tutor, curador): _____

Documento de Identidade: _____

Sexo: (M) (F) **Data de Nascimento:** _____

Endereço: _____

Bairro: _____ **Cidade:** _____ **Estado:** _____ **CEP:** _____

DECLARAÇÃO DO INVESTIGADOR

Nós estamos convidando você a participar de um estudo de pesquisa. O propósito deste formulário de consentimento é dar-lhe as informações que você irá precisar para ajudá-lo a decidir se deseja participar ou não do estudo. Por favor, leia o formulário cuidadosamente. Você poderá fazer perguntas sobre os objetivos da pesquisa, os possíveis riscos e benefícios, seus direitos como um voluntário, e qualquer informação adicional sobre a pesquisa caso este formulário não esteja claro. Quando nós tivermos respondido todas as suas perguntas, você poderá decidir se deseja participar do estudo ou não. Nós lhe daremos uma cópia deste formulário para seus registros.

PROPÓSITO E BENEFÍCIOS

Você está sendo convidado como voluntário a participar desta pesquisa realizada pela Universidade Federal da Bahia, porque você é portador da anemia falciforme. Este estudo tem o objetivo de avaliar as condições de um tipo de células-tronco presente na medula óssea que é capaz de reparar vasos sanguíneos danificados. O estudo pode ser benéfico a você e todos os pacientes falciformes se descobirmos a quantidade e como estão essas células na medula óssea. Caso seja identificado algum defeito dessas células isso pode estar relacionado ao aparecimento de algumas manifestações clínicas da doença e futuramente poderemos propor uma nova terapia para diminuir alguns sintomas da anemia falciforme.

OBJETIVO: O objetivo deste estudo é avaliar a quantidade, isolar e analisar o aspecto e função das Células Progenitoras Endoteliais, um tipo de célula-tronco que possui a capacidade de reparar os vasos sanguíneos danificados, e está presente na medula óssea e sangue periférico, para propormos futuramente uma nova terapia que possa reduzir alguns sintomas da anemia falciforme.

PROCEDIMENTO: Se você concordar em participar, nós pediremos sua permissão para coletar 4mL do aspirado medular (volume de uma colher de chá), que já será retirado durante o procedimento de diagnóstico que você será submetido. Você pode ajudar a pesquisa de células-troncos doando este material. A doação é um ato simples e livre, sem prejuízo para seu atendimento médico, e para isso basta que você expresse sua vontade através da assinatura desse termo de consentimento. Esse procedimento não implicará em nenhuma despesa adicional para você ou sua família e nem será utilizado para fins lucrativos. De acordo com nossa legislação, é proibida qualquer forma de remuneração ou recompensa pela doação de material biológico. Os pesquisadores poderão entrar em contato com você ou seu médico de encaminhamento para atualizar as informações da história médica.

SIGILO: Seu médico irá tratar da sua identidade com padrões profissionais de sigilo. Seu prontuário vai permanecer confidencial. Os participantes não serão identificados em nenhuma publicação que possa resultar deste estudo, bem como o Comitê de Ética envolvido no estudo pode solicitar revisão de seu prontuário; no entanto, ele vai continuar em sigilo, porque apenas um número e as suas iniciais serão usados para identificação. Os nomes dos participantes ou o material que identifique os participantes não serão liberados sem permissão por escrito, exceto se exigido por lei. Uma cópia deste consentimento informado será arquivada no seu prontuário médico e uma será fornecida a você.

PARTICIPAÇÃO/ENCERRAMENTO: Você é livre para se recusar a participar ou retirar seu termo de adesão e informação e interromper a participação a qualquer momento. A participação é voluntária e a recusa em participar não irá acarretar qualquer penalidade ou

perda de benefícios. A recusa ou interrupção não prejudicará de forma alguma sua capacidade de receber tratamento, agora ou no futuro, nas instituições envolvidas no estudo. Você também poderá anular este consentimento, mesmo após te-lo assinado.

CUSTOS DA PARTICIPAÇÃO: Nem você ou sua companhia de seguros serão onerados pelos procedimentos necessários para a coleta, análise, procedimentos e armazenamento do material biológico.

INDENIZAÇÃO: Ao assinar este termo, você não abre mão de nenhum direito legal que você eventualmente teria em caso de conduta errônea ou negligente de qualquer membro da equipe multiprofissional de saúde que lhe dará assistência durante o estudo.

OUTRAS INFORMAÇÕES:

Você não será pago por sua participação, nem será cobrado nenhuma taxa extra como resultado da participação neste estudo. Sua participação é completamente voluntária, você pode recusar-se a participar ou pode retirar-se do estudo a qualquer hora e pedir que todas as amostras sejam destruídas. Para fazer isso você irá entrar em contato com um dos investigadores. A recusa ou retirada não levará a nenhuma penalização ou perda de benefícios aos quais você está habilitado. Sua identidade como doador de medula óssea irá permanecer confidencial. As amostras serão codificadas e não identificadas pelo nome do sujeito.

DECLARAÇÃO DO PACIENTE:

Eu, _____ tive tempo para ler e pensar sobre as informações contidas neste formulário antes de conceder a doação para o estudo.

Participarei doando espontaneamente o aspirado de medula óssea após o procedimento de diagnóstico hematológico. Fui devidamente informado dos objetivos da doação e estou ciente que esta coleta busca oferecer um material para o estudo de células tronco presentes na medula óssea. Recebi esclarecimento sobre o anonimato desta doação e estou ciente que,

mesmo tendo concordado em doar, o aspirado medular só será coletado se o procedimento de diagnóstico transcorrer sem intercorrências.

Declaro que estou ciente de que uma vez feita a doação, o material colhido não poderá ser reivindicado futuramente para meu próprio uso ou de algum membro da minha família. Entendo também que posso anular este consentimento a qualquer momento antes da minha cirurgia.

Declaro ter recebido uma cópia deste termo de consentimento e se qualquer problema ou questão aparecer durante o estudo com relação aos meus direitos enquanto paciente deste estudo, ou com relação a alguma lesão que venha a acontecer relacionada a esse estudo, compreendo que devo entrar em contato com: **Dra. Songeli Menezes Freire Cel.: 71/ 8746-6413, e/ou em caso de eventual necessidade com o Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa, Professor, Doutor, Antônio dos Santos Barata, Tel.: 71/3283-8043 no 1º andar do Hospital Universitário Professor Edgar Santos (HUPES).**

Dr: _____

Telefone: _____

Assinatura do Paciente: _____

Assinatura da Testemunha: _____

Assinatura do Médico: _____

Local e data: _____

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**Aspectos Imunobiológicos da Células Progenitoras Endoteliais na Anemia Falciforme.****Procedimento: Coleta de aspirado/ biópsia de medula óssea****DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO PACIENTE OU RESPONSÁVEL LEGAL****1. Nome do Paciente:**

2. Documento de Identidade: _____**3. Sexo: (M) (F) Data Nascimento:** _____**4. Endereço:** _____

Bairro: _____ **Cidade:** _____ **Estado:** _____**CEP:** _____ **Telefone:** _____**5. Responsável legal:** _____

Natureza (grau de parentesco, tutor, curador): _____

Documento de Identidade: _____

Sexo: (M) (F) Data de Nascimento: _____

Endereço: _____

Bairro: _____ Cidade: _____ Estado: _____ CEP: _____

DECLARAÇÃO DO INVESTIGADOR

Nós estamos convidando você a participar de um estudo de pesquisa. O propósito deste formulário de consentimento é dar-lhe as informações que você irá precisar para ajudá-lo a decidir se deseja participar ou não do estudo. Por favor, leia o formulário cuidadosamente. Você poderá fazer perguntas sobre os objetivos da pesquisa, os possíveis riscos e benefícios, seus direitos como um voluntário, e qualquer informação adicional sobre a pesquisa caso este formulário não esteja claro. Quando nós tivermos respondido todas as suas perguntas, você poderá decidir se deseja participar do estudo ou não. Nós lhe daremos uma cópia deste formulário para seus registros.

PROPÓSITO E BENEFÍCIOS

Você está sendo convidado como voluntário a participar desta pesquisa realizada pela Universidade Federal da Bahia, porque você é portador da anemia falciforme. Este estudo tem o objetivo de avaliar as condições de um tipo de células-tronco presente na medula óssea que é capaz de reparar vasos sanguíneos danificados. O estudo pode ser benéfico a você e todos os pacientes falciformes se descobrirmos a quantidade e como estão essas células na medula óssea. Caso seja identificado algum defeito dessas células isso pode estar relacionado ao

aparecimento de algumas manifestações clínicas da doença e futuramente poderemos propor uma nova terapia para diminuir alguns sintomas da anemia falciforme.

OBJETIVO: O objetivo deste estudo é avaliar a quantidade, isolar e analisar o aspecto e função das Células Progenitoras Endoteliais, um tipo de célula-tronco que possui a capacidade de reparar os vasos sanguíneos danificados, e está presente na medula óssea e sangue periférico, para propormos futuramente uma nova terapia que possa reduzir alguns sintomas da anemia falciforme.

PROCEDIMENTO: Se você concordar em participar, nós pediremos sua permissão para coletar 4mL do aspirado medular (volume de uma colher de chá), que já será retirado durante o procedimento de diagnóstico que você será submetido. Você pode ajudar a pesquisa de células-troncos doando este material. A doação é um ato simples e livre, sem prejuízo para seu atendimento médico, e para isso basta que você expresse sua vontade através da assinatura desse termo de consentimento. Esse procedimento não implicará em nenhuma despesa adicional para você ou sua família e nem será utilizado para fins lucrativos. De acordo com nossa legislação, é proibida qualquer forma de remuneração ou recompensa pela doação de material biológico. Os pesquisadores poderão entrar em contato com você ou seu médico de encaminhamento para atualizar as informações da história médica.

SIGILO: Seu médico irá tratar da sua identidade com padrões profissionais de sigilo. Seu prontuário vai permanecer confidencial. Os participantes não serão identificados em nenhuma publicação que possa resultar deste estudo, bem como o Comitê de Ética envolvido no estudo pode solicitar revisão de seu prontuário; no entanto, ele vai continuar em sigilo, porque apenas um número e as suas iniciais serão usados para identificação. Os nomes dos participantes ou o material que identifique os participantes não serão liberados sem permissão por escrito, exceto se exigido por lei. Uma cópia deste consentimento informado será arquivada no seu prontuário médico e uma será fornecida a você.

PARTICIPAÇÃO/ENCERRAMENTO: Você é livre para se recusar a participar ou retirar seu termo de adesão e informação e interromper a participação a qualquer momento. A participação é voluntária e a recusa em participar não irá acarretar qualquer penalidade ou perda de benefícios. A recusa ou interrupção não prejudicará de forma alguma sua capacidade de receber tratamento, agora ou no futuro, nas instituições envolvidas no estudo. Você também poderá anular este consentimento, mesmo após te-lo assinado.

CUSTOS DA PARTICIPAÇÃO: Nem você ou sua companhia de seguros serão onerados pelos procedimentos necessários para a coleta, análise, procedimentos e armazenamento do material biológico.

INDENIZAÇÃO: Ao assinar este termo, você não abre mão de nenhum direito legal que você eventualmente teria em caso de conduta errônea ou negligente de qualquer membro da equipe multiprofissional de saúde que lhe dará assistência durante o estudo.

OUTRAS INFORMAÇÕES:

Você não será pago por sua participação, nem será cobrado nenhuma taxa extra como resultado da participação neste estudo. Sua participação é completamente voluntária, você pode recusar-se a participar ou pode retirar-se do estudo a qualquer hora e pedir que todas as amostras sejam destruídas. Para fazer isso você irá entrar em contato com um dos investigadores. A recusa ou retirada não levará a nenhuma penalização ou perda de benefícios aos quais você está habilitado. Sua identidade como doador de medula óssea irá permanecer confidencial. As amostras serão codificadas e não identificadas pelo nome do sujeito.

DECLARAÇÃO DO PACIENTE:

Eu, _____ tive tempo para ler e pensar sobre as informações contidas neste formulário antes de conceder a doação para o estudo.

Participarei doando espontaneamente o aspirado de medula óssea após o procedimento de diagnóstico hematológico. Fui devidamente informado dos objetivos da doação e estou ciente que esta coleta busca oferecer um material para o estudo de células tronco presentes na medula óssea. Recebi esclarecimento sobre o anonimato desta doação e estou ciente que, mesmo tendo concordado em doar, o aspirado medular só será coletado se o procedimento de diagnóstico transcorrer sem intercorrências.

Declaro que estou ciente de que uma vez feita a doação, o material colhido não poderá ser reivindicado futuramente para meu próprio uso ou de algum membro da minha família. Entendo também que posso anular este consentimento a qualquer momento antes da minha cirurgia.

Declaro ter recebido uma cópia deste termo de consentimento e se qualquer problema ou questão aparecer durante o estudo com relação aos meus direitos enquanto paciente deste estudo, ou com relação a alguma lesão que venha a acontecer relacionada a esse estudo, compreendo que devo entrar em contato com: **Dra. Songeli Menezes Freire Cel.: 71/ 8746-6413, e/ou em caso de eventual necessidade com o Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa, Professor, Doutor, Antônio dos Santos Barata, Tel.: 71/3283-8043 no 1º andar do Hospital Universitário Professor Edgar Santos (HUPES).**

Dr: _____

Telefone: _____

Assinatura do Paciente: _____

Assinatura da Testemunha: _____

Assinatura do Médico: _____

Local e data: _____



**COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA – CEP/MCO/UFBA
MATERNIDADE CLIMÉRIO DE OLIVEIRA
UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA**

IORG0003460. IRB00004123 June 30, 2012 – January 31, 2014
Assurance FWA00002471, May 31, 2011 – February 08, 2014


Rua do Limoeiro, nº 137 – Nazaré Cep: 40.005-150 – Salvador-Bahia
Telefax.: (71) 3283-9210/9211 e-mail: cepmco@ufba.br/cepmco@gmail.com

PARECER/RESOLUÇÃO ADITIVA N.º086/2011

Para análise e deliberação deste Institucional a Professora, Doutora, **Songeli Menezes Freire**, Pesquisadora Responsável pelo Projeto de Pesquisa “Aspectos Imunobiológicos das Células Progenitoras Endoteliais na Anemia Falciforme”, posto sob pendência, por este Colegiado, em 02 de Dezembro de 2010 através do Parecer/Resolução N° 066/2010, encaminhou, em 05 de Setembro de 2011, o “Prontuário de Pesquisa; Declaração do IPERBA; Ofício de Prestação de contas do CNPq”, bem como os esclarecimentos que foram satisfatórios em atendimento às pendências expostas no referido Parecer.

Cumprindo as exigências éticas para a execução da pesquisa, fica a mesma aprovada por esta Instância.

Salvador, 08 de Setembro de 2011.


Professor, Doutor, Eduardo Martins Netto
Coordenador – CEP/MCO/UFBA

Observação importante. Toda a documentação anexa ao Protocolo proposto e rubricada pelo (a) Pesquisador (a), arquivada neste CEP, e também a outra devolvida com a rubrica da Secretária deste ao (à) mesmo (a), faz parte intrínseca deste Parecer/Resolução Aditiva e nas “Recomendações Adicionais” apenas, **bem como a impostergável entrega de relatórios parciais e final** como consta nesta liberação, (Modelo de Redação para Relatório de Pesquisa, anexo).

