



Efeitos das Plaquetas de Indivíduos Saudáveis e de Pacientes com Anemia Falciforme na Formação de Estruturas Capilares por Células Endoteliais

Autores: Dienifer Da Costa Oliveira, Yasmin Oliveira De Colo, Pamela Lara Brito, Lidiane Torres, Nicola Conran, Fernanda C. Z. Fabris

Palavras chaves: Anemia falciforme; Angiogênese; Células Endoteliais, Plaquetas; Vasos sanguíneos

Introdução: A anemia falciforme é uma doença hereditária na qual as hemácias apresentam o formato de foice, que dificulta sua passagem nos vasos sanguíneos e contribui para as crises de vaso-oclusão e causa processos inflamatórios. A angiogênese, que é a formação de novos vasos a partir das células endoteliais, pode ser benéfica ou prejudicial na anemia falciforme e estes pacientes têm tendência de apresentar ativação plaquetária.

Objetivo: O objeto deste estudo foi avaliar se plaquetas de indivíduos saudáveis e de indivíduos com anemia falciforme influenciam na capacidade de células endoteliais formarem estruturas capilares, parecidos com vasos sanguíneos.

Metodologia: Células endoteliais do tipo HUVEC (*Human Umbilical Vein Endothelial Cells*) (5×10^4 cél/mL em meio; 100 μ L) foram incubadas em poços de placas com Matrigel (com todos os nutrientes necessários para a proliferação e manutenção das células) e na presença ou ausência de plaquetas (1×10^5 plaquetas/poço; 100 μ L). As células foram incubadas com dois tipos de plaquetas: plaquetas separadas do sangue de indivíduos saudáveis (CONT, n=2) e plaquetas de indivíduos com diagnóstico de anemia falciforme (AF, n=2). Após incubação das células endoteliais por 20 h (com ou sem plaquetas), foram tiradas 5 fotos das células em cada poço com um microscópio invertido (aumento de 40x, equipamento Zeiss Axiovert S100) com câmera acoplada (Moticam 2500), para a quantificação e análise das estruturas. Cada porção de estrutura capilar entre as ramificações foi considerada como um ramo; cada



ponta deste ramo recebeu o nome de extremidade; extremidades das quais saem pelo menos 3 ramos, foi chamada de nó; a união de vários ramos, foi chamado de grandes junções. As estruturas formadas foram quantificadas com o auxílio do software ImageJ_Angiogenesis Analyzer.

Resultados: A **Figura 1** mostra imagens da formação de estruturas capilares pelas células endoteliais na ausência (BASAL) ou presença de plaquetas dos indivíduos saudáveis (CONT) ou dos indivíduos com anemia falciforme (AF). A estruturas capilares, pontos de ramificações e junções foram contados em duas fotos para cada grupo experimental. Os dados obtidos foram mostrados em forma de tabela (**Tabela 1**) e gráficos (**Figura 2**).

Através da observação dos resultados é possível ver que, quando se coloca a plaquetas de indivíduos saudáveis (Figura 1 e 2, painéis CON) em cultura com as células endoteliais, ocorre um aumento na formação de vasos, quando comparado ao grupo sem plaquetas (basal). Um efeito similar é observado quando as células endoteliais são incubadas na presença de plaquetas de indivíduos com anemia falciforme (AF).

Conclusão: As plaquetas têm a capacidade de aumentar, de forma significativa, a formação de estruturas capilares pelas células endoteliais. Estes achados indicam um papel das plaquetas na formação de novos vasos e a estimulação da angiogênese. Apesar das plaquetas de pacientes com anemia falciforme circularem num estado ativado, os efeitos observados das plaquetas na formação de estruturas capilares não eram significativamente maiores do que os efeitos estimuladores das plaquetas de controles.

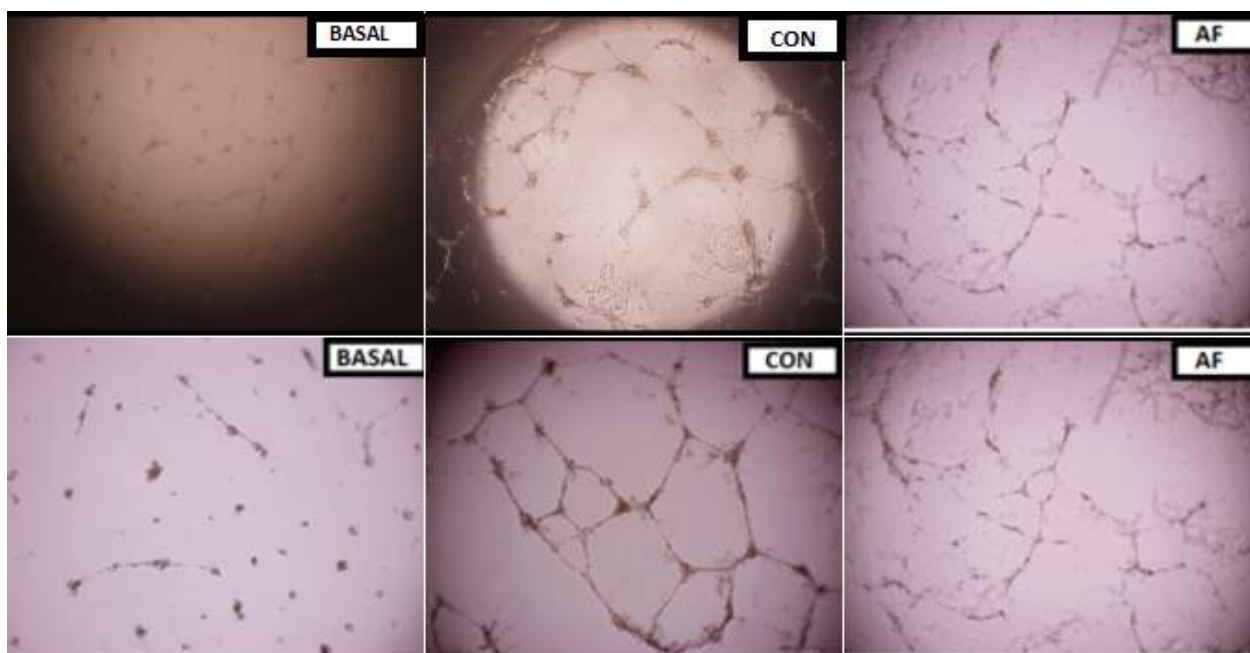


Figura 1: Avaliação das estruturas capilares na cocultura de células endoteliais e plaquetas. Grupo basal: só tem presença de célula endotelial; Grupo CON: grupo controle no qual foi feito o cocultivo de células endoteliais e plaquetas de pessoas saudáveis; Grupo AF: Células endoteliais e plaquetas de pacientes AF.

Tabela 1: Quantificação dos capilares em culturas de células HUVEC incubadas sem (basal) e com plaquetas de indivíduos saudáveis (Controle) e de indivíduos com anemia falciforme (AF).

	Pontos de ramificações	Capilares	Junções
Foto 1: Basal	9	4	0
Foto 2: Basal	16	22	1
Foto 3: Controle	23	59	13
Foto 4: Controle	32	84	14
Foto 5: AF	33	88	13
Foto 6: AF	39	90	16

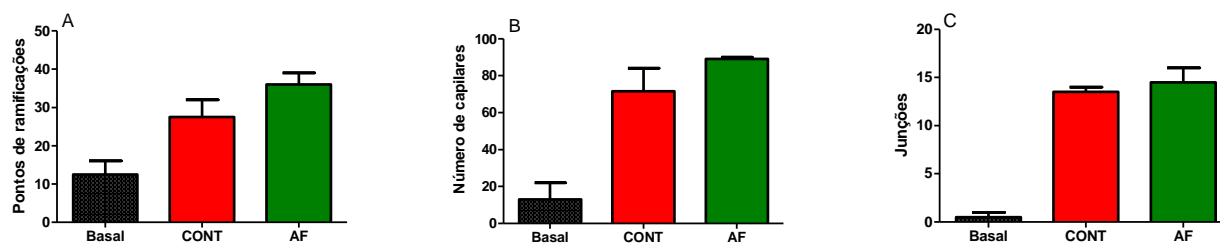


Figura 2: Quantificação das estruturas capilares: (A) pontos de ramificações; (B) capilares e (C) junções em culturas de células HUVEC incubadas sem (basal) e com plaquetas de indivíduos saudáveis (Controle, n=2) e de indivíduos com anemia falciforme (AF, n=2).