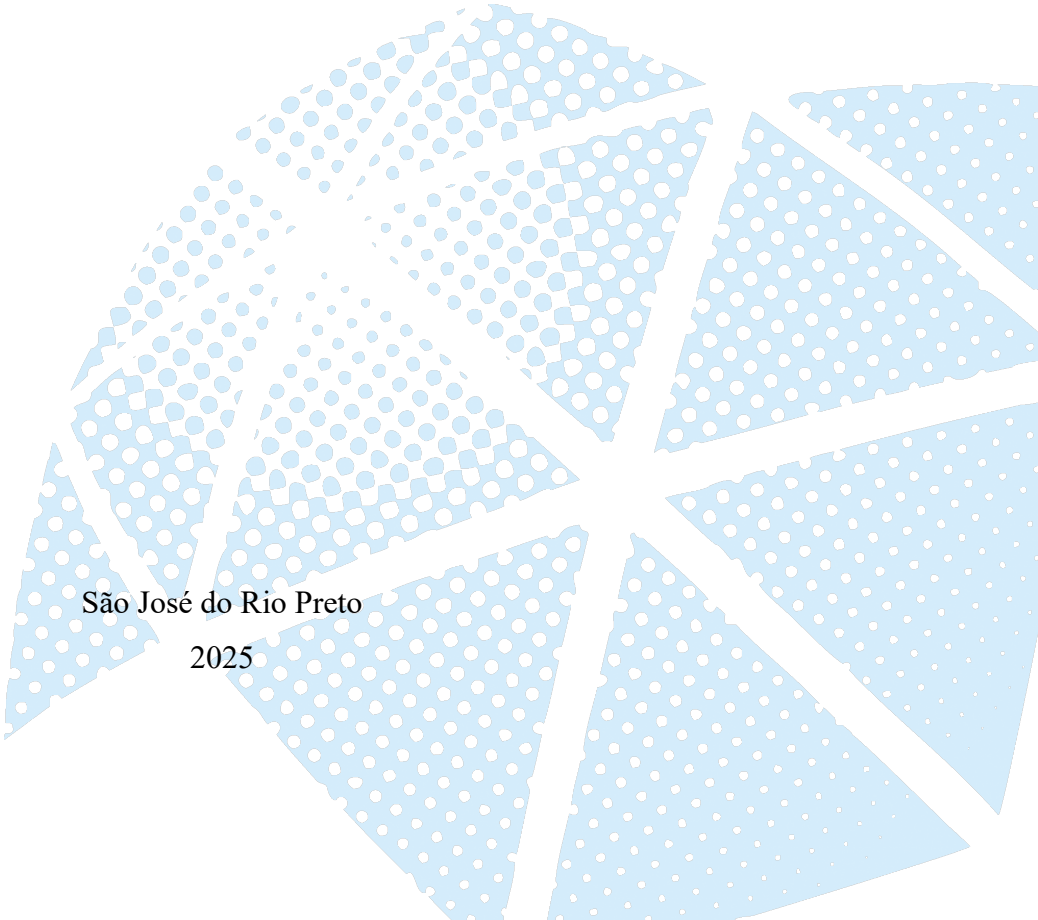


UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas - Campus de São José do Rio Preto

Júlia Camargo Ricci

**Estudo Histopatológico com Aplicação das Microscopias de Luz e Não-Lineares em
Trombos Isquêmicos Obtidos por Recuperação Endovascular**

São José do Rio Preto
2025



Júlia Camargo Ricci

Estudo Histopatológico com Aplicação das Microscopias de Luz e Não-Lineares em Trombos Isquêmicos Obtidos por Recuperação Endovascular

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biociências, junto ao Programa de Pós-Graduação em Biociências, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de São José do Rio Preto.

Área de Concentração: Biologia Estrutural e Funcional

Orientadora: Profa. Dra. Sonia Maria Oliani

Coorientadora: Raquel Cristina Trovo Hidalgo

São José do Rio Preto

2025

R491e

Ricci, Júlia Camargo

Estudo Histopatológico com Aplicação das Microscopias de Luz e Não-Lineares em Trombos Isquêmicos Obtidos por Recuperação Endovascular / Júlia Camargo Ricci. -- São José do Rio Preto, 2025
63 p. : fotos

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto

Orientadora: Sonia Maria Olini

Coorientadora: Raquel Cristina Trovo Hidalgo

1. acidente vascular cerebral isquêmico (AVCI). 2. trombectomia mecânica. 3. proteína anexina A1 (ANXA1). 4. inflamação. 5. plaquetas. I. Título.

IMPACTO POTENCIAL DESTA PESQUISA

Este estudo contribui para o avanço científico e técnico ao melhorar a compreensão da composição dos trombos e sua influência na eficácia da Trombectomia Mecânica. Social e economicamente, pode reduzir a mortalidade, incapacidades e custos hospitalares do AVCI. Inovador e educacional, fortalece a formação de especialistas e impulsiona novas abordagens terapêuticas. No cenário internacional, a colaboração com instituições estrangeiras amplia seu impacto. Regional e nacionalmente, pode influenciar protocolos clínicos, promovendo um tratamento mais eficaz e sustentável para a saúde pública.

POTENTIAL IMPACT OF THIS RESEARCH

This study contributes to scientific and technical progress by improving understanding of thrombus composition and its influence on the effectiveness of Mechanical Thrombectomy. Socially and economically, it can reduce the mortality, disability and hospital costs of stroke. Innovative and educational, it strengthens the training of specialists and drives new therapeutic approaches. On the international stage, collaboration with foreign institutions increases its impact. Regionally and nationally, it can influence clinical protocols, promoting more effective and sustainable treatment for public health.

JÚLIA CAMARGO RICCI

**Estudo Histopatológico com Aplicação das Microscopias de Luz e Não-Lineares em
Trombos Isquêmicos Obtidos por Recuperação Endovascular**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biociências, junto ao Programa de Pós- Graduação em Biociências, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de São José do Rio Preto.

Área de Concentração: Biologia Estrutural e Funcional

Data da defesa: 05/02/2025

Banca Examinadora:

Profa. Dra. Sonia Maria Olini

UNESP - Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas - Campus de São José do Rio Preto

Profa. Dra. Claudia Regina Bonini Domingos

UNESP - Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas - Campus de São José do Rio Preto

Prof. Dr. Rafael Fernandes Ferreira

FAMERP - Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Profa. Dra. Sonia Maria Oliani pela oportunidade de trabalhar no Laboratório de Imunomorfologia, orientação, apoio, confiança e toda contribuição ao longo destes anos.

Aos meus pais, Carlos Henrique Ricci e Cristina Franco de Camargo Ricci, pelo incentivo, amor e apoio incondicional a cada passo desta trajetória.

À Stefanie Oliveira de Sousa pela amizade diária que foi essencial no meu crescimento profissional e pessoal, assim como pela constante ajuda em experimentos e análises de dados, incentivos, conselhos e ótima companhia em diversos momentos desta jornada.

À minha coorientadora Dra. Raquel Cristina Trovo Hidalgo e Rodrigo Rodrigues por toda ajuda e ensinamentos na realização deste trabalho.

À universidade IBILCE/UNESP, seu corpo docente, direção e administração pela infraestrutura, suporte e possibilidade de realizar o curso de Pós-graduação em Biociências.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento nº 88887.805073/2023-00 e CAPES/PrInt - Código de Financiamento nº 88887.976638/2024-00.

À Dra. Yanira Rizzo Vasquez por me aceitar, me acolher e pelos ótimos ensinamentos no *Institute of Pharmaceutical Science* no *King's College London*. Também agradeço ao Alembert Lino Alvarado, Rafael Campos e Amanda Cavalcante pelo apoio e amizade durante meu período em Londres.

Ao *King's College London* e seus coordenadores pela disponibilização dos equipamentos e infraestrutura em Londres.

Ao Rodrigo de Andrade Natal e Thiago Campos pelas explicações sobre o funcionamento óptico das microscopias confocais e ajuda no manuseio dos microscópios por Geração de Segundo-Harmônico e por Excitação de Dois-Fótons.

Agradeço o acesso ao equipamento e assistência provida pelo Instituto Nacional de Fotônica Aplicado à Biologia Celular (INFABIC) na Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP); INFABIC é cofinanciada pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) (2014/50938-8) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) (465699/2014-6).

Às minhas amigas Ingrid Iris Pereira, Juliana Prado Gusson Zanetoni, Laura Luciana de Melo Moreira Silva e Bruna Carolina da Silva pelo companhia no meu período no Laboratório de Imunomorfologia, que me ajudaram diariamente na minha trajetória acadêmica e pessoal, tornando todos os momentos mais divertidos.

À Profa. Dra. Flavia Cristina Rodrigues Lisoni e aos meus professores de Biociências pelos ensinamentos fundamentais para minha formação acadêmica e ótimas aulas.

Ao meu irmão, Fábio Camargo Ricci, pela companhia e carinho durante toda minha vida.

Aos meus amigos que contribuíram para minha jornada, minha eterna mensagem de agradecimento pelo suporte essencial.

A todos que participaram desta pesquisa e colaboraram na obtenção e análise de dados.

E a todos que de maneira direta ou indireta fizeram parte deste trabalho e da minha formação, muito obrigada!

RESUMO

A incidência do acidente vascular cerebral isquêmico (AVCI) tem aumentado mundialmente, sendo uma das principais causas de morte e incapacidades. Estudar o AVCI é crucial para desenvolver intervenções eficazes, melhorar tratamentos e reabilitações, além de reduzir o impacto socioeconômico da doença. Devido à importância para identificar potenciais métodos menos invasivos de resposta terapêutica no processo de Trombectomia Mecânica (TM), trombos isquêmicos foram coletados de pacientes com oclusão de grandes vasos. Com esse objetivo, 55 amostras foram categorizadas com base no número de passagens endovasculares do catéter durante o processamento TM, em 1, 2-3 ou +4 passagens. Amostras foram fixadas em paraformaldeído a 4%, processadas e coradas para análises histopatológicas e imuno-histoquímicas, utilizando as microscopias de luz e não-lineares. As avaliações revelaram heterogeneidade significativa na estrutura e organização dos trombos. Os constituintes predominantes incluíram eritrócitos, fibrina, leucócitos e plaquetas, com padrões distintos observados em trombos vermelhos ricos em eritrócitos e brancos com maiores concentrações de fibrina e leucócitos. O grupo de +4 passagens apresenta prevalência de trombos brancos, indicando mudança na sua composição quando relacionada aos procedimentos de TM prolongados. Houve associação entre o aumento da deposição de fibrina e a maior densidade dos trombos, particularmente nos trombos brancos e de +4 passagens durante a recuperação endovascular. Em regiões ricas em fibrina foi encontrada maior concentração de plaquetas e leucócitos, principalmente em trombos de +4 passagens. Os resultados mostram que a isquemia é um processo multicelular com várias etapas que estimula a inflamação e agregação de plaquetas, ativando os leucócitos e fibrina no vaso. Ainda, os leucócitos observados nos trombos expressam a proteína anti-inflamatória Anexina A1 (ANXA1). Em conjunto nossos dados mostram que a composição histopatológica identificada nos trombos pode influenciar significativamente na eficácia de sua remoção durante os procedimentos endovasculares e, a presença da ANXA1 em leucócitos sugere esta proteína como um alvo para doenças neuroinflamatórias, incluindo AVCI.

Palavras-chave: acidente vascular cerebral isquêmico (AVCI); trombectomia mecânica; proteína anexina A1 (ANXA1); inflamação; plaquetas; leucócitos.

ABSTRACT

The incidence of ischaemic cerebrovascular accident (CVA) has increased worldwide and is one of the main causes of death and disability. Studying stroke is crucial to developing effective interventions, improving treatment and rehabilitation, and reducing the socioeconomic impact of the disease. Due to the importance of identifying potential less invasive methods of therapeutic response in the Mechanical Thrombectomy (MT) process, ischaemic thrombi were collected from patients with large vessel occlusion. To this end, 55 samples were categorised based on the number of endovascular catheter passes during the MT process, into 1, 2-3 or +4 passes. Samples were fixed in 4% paraformaldehyde, processed and stained for histopathological and immunohistochemical analyses using light and non-linear microscopy. The evaluations revealed significant heterogeneity in the structure and organisation of the thrombi. The predominant constituents included erythrocytes, fibrin, leukocytes and platelets, with distinct patterns observed in red thrombi rich in erythrocytes and white thrombi with higher concentrations of fibrin and leukocytes. The +4-pass group showed a prevalence of white thrombi, indicating a change in their composition when related to prolonged TM procedures. There was an association between increased fibrin deposition and higher thrombus density, particularly in white and +4-pass thrombi during endovascular recovery. In fibrin-rich regions, a higher concentration of platelets and leucocytes was found, especially in +4-pass thrombi. The results show that ischaemia is a multi-stage, multi-cellular process that stimulates inflammation and platelet aggregation, activating leukocytes and fibrin in the vessel. In addition, the leucocytes observed in the thrombi express the anti-inflammatory protein Annexin A1 (ANXA1). Taken together, our data show that the histopathological composition identified in thrombi can significantly influence the effectiveness of their removal during endovascular procedures, and the presence of ANXA1 in leukocytes suggests this protein as a target for neuroinflammatory diseases, including stroke.

Key words: ischaemic cerebral vascular accident (CVA); mechanical thrombectomy; annexin A1 protein (ANXA1); inflammation; platelets; leucocytes

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Identificação dos principais sintomas de AVCI.....	13
Figura 2. Trombo retirado pelo procedimento de Trombectomia Mecânica.....	14
Figura 3. Cascata de coagulação.....	16
Figura 4. Fibrinólise.....	17
Figura 5. Mudanças dinâmicas dos trombos dependentes do tempo no AVCI.....	18
Figura 6. Células imunes na trombólise.....	23
Figura 7. Interação de neutrófilos e plaquetas na patogênese do AVC.....	24
Figura 8. Representação esquemática da ANXA1.....	25
Figura 9. Ações biológicas da ANXA1.....	26
Figura 10. Microscopia de Luz e Confocal.....	33
Figura 11. Geração de Segundo-Harmônico.....	34
Figura 12. Excitação de Dois-Fótons.....	35
Figura 13. Trombos de pacientes com AVCI obtidos pela técnica de Trombectomia Mecânica.....	37
Figura 14. Diferenças histológicas entre trombos vermelhos e brancos.....	38
Figura 15. Poliedrócitos pelas Microscopias de Luz e Excitação de Dois-Fótons.....	39
Figura 16. Quantidade de plaquetas no sangue periférico de pacientes com AVCI.....	40
Figura 17. Plaquetas.....	41
Figura 18. Leucócitos e deposição de fibrina no trombo AVCI.....	42
Figura 19. Densidade da fibrina observada após Trombectomia Mecânica.....	43
Figura 20. Expressão da proteína anti-inflamatória Anexina A1 (ANXA1) em trombos de AVCI.....	44

LISTA DE ABREVIATURAS

AHA	<i>American Heart Association</i>
AMPK	Proteína Quinase Ativada por Monofosfato de Adenosina
ANOVA	Análise de Variância
ANXA1	Proteína Anexina A1
ASPECTS	<i>Alberta Stroke Program Early CT Score</i>
AVC	Acidente Vascular Cerebral
AVCI	Acidente Vascular Cerebral Isquêmico
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i>
CAAE	Certificado de Apresentação de Apreciação Ética
CAMs	Moléculas de Adesão Celular
COX-2	Cicloxigenase-2
cPLA2	Fosfolipase A2 citosólica
FDP	Produtos de Degradação da Fibrina
FPR	Receptor de Formil Peptídeo
FPR2	Receptor 2 do Peptídeo N-formil
GP	Glicoproteína
GR	Glicocorticoide
HGFR-TK	Tirosina Quinase do Receptor do Fator de Crescimento de Hepatócitos
I/R	Isquemia/Reperusão
IL	Interleucina
MEC	Matriz Extracelular
MMP	Metaloproteinases da Matriz
NDD	<i>Non-Descanned Detector</i>
NETs	Armadilhas Extracelulares dos Neutrófilos
NIHSS	<i>National Institute of Health Stroke Scale</i>
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PDGFR-TK	Tirosina Quinase do Receptor do Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas
PKC	Proteína Quinase C
PLA2	Fosfolipase A2

PMT	<i>Photomultiply Tube Detector</i>
RM	Ressonância Magnética
RNI	Relação Normalizada Internacional
ROS	Espécies Reativas de Oxigênio
rt-PA	Ativador de Plasminogênio Tecidual Recombinante
SHG	<i>Second Harmonic Generation</i>
TC	Tomografia Computadorizada
TCSC	Tomografia Computadorizada Sem Contraste
TICI	<i>Trombolysis In Cerebral Infarction</i>
TM	Trombectomia Mecânica
tPA	Ativador de Plasminogênio Tecidual
TPBS	<i>Tween Phosphate buffered saline</i>
TPF	<i>Two-Photon Fluorescence</i>
TPPI	Inibidores da Via de Fator Tecidual
vWF	Fator de Von Willebrand

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
1.1 ACIDENTE VASCULAR CEREBRAL ISQUÊMICO (AVCI)	13
1.2 COMPONENTES DO TROMBO	17
1.2.1 Fibrina	19
1.2.2 Plaquetas	19
1.2.3 Eritrócitos	20
1.2.4 Leucócitos	21
1.3 MATRIZ EXTRACELULAR	22
1.4 INFLAMAÇÃO	23
1.5 PROTEÍNA ANEXINA A1	25
2 OBJETIVOS	28
2.1 OBJETIVO GERAL	28
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	28
3 MATERIAIS E MÉTODOS	29
3.1 PACIENTES	29
3.2 PROCEDIMENTO DE TROMBECTOMIA MECÂNICA	30
3.3 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS	31
3.4 FIXAÇÃO E PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO	31
3.5 ANÁLISES IMUNO-HISTOQUÍMICAS	31
3.6 ANÁLISES IMUNOFLUORESCENTES	32
3.7 MICROSCOPIAS CONFOCAIS NÃO-LINEARES	33
3.7.1 Microscopia por Geração de Segundo Harmônico	33
3.7.2 Microscopia de Excitação de Dois-fótons	35
3.8 CLASSIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS	36
3.9 ANÁLISE DAS IMAGENS	36
3.10 ANÁLISES ESTATÍSTICAS	36
4 RESULTADOS	37
4.1 ANÁLISES MACROSCÓPICAS E HISTOPATOLÓGICAS DOS TROMBOS	37
4.2 POLIEDRÓCITOS	39
4.3 ANÁLISES DE PLAQUETAS	40

4.4 LEUCOCITOS E DENSIDADE DA FIBRINA.....	41
4.5 LEUCÓCITOS E EXPRESSÃO DA PROTEINA ANXA1	44
REFERÊNCIAS	50

1 INTRODUÇÃO

1.1 Acidente Vascular Cerebral Isquêmico (AVCI)

Entre as doenças cerebrovasculares, o Acidente Vascular Cerebral (AVC) é a segunda maior causa de morte no mundo e a terceira de mortes e incapacidades combinadas (FEIGIN *et al.*, 2022). Todos os anos, ocorrem novos ou recorrentes AVCs em aproximadamente 795.000 pessoas, sendo cerca de 610.00 casos de AVC novos e 185.000 recorrentes (MARTIN *et al.*, 2024). De todos os AVCs, cerca de 87% são isquêmicos e 13% hemorrágicos (AJOOLABADY *et al.*, 2021). O AVC Isquêmico (AVCI) ocorre devido à obstrução de um vaso sanguíneo cerebral devido à formação de um coágulo/trombo, enquanto o hemorrágico é causado pela ruptura do vaso, levando ao sangramento no parênquima cerebral (PAUL *et al.*, 2021).

Para identificar rapidamente os principais sintomas do AVC, o *American Heart Association* (AHA) adotou o acrônimo B.E.F.A.S.T.: *Balance* (perda de equilíbrio), *Eyes* (alterações na visão), *Face* (queda facial), *Arm* (fraqueza nos braços), *Speech* (dificuldade ao falar) e *Time* (agir rapidamente). Caso o indivíduo tenha esses sintomas, a última letra do acrônimo é referente ao “tempo”, no qual a pessoa necessita ir ao hospital para a resolução da doença o mais rápido possível (AROOR *et al.*, 2017).



Figura 1: Identificação dos principais sintomas de AVCI. Cinco principais sintomas que podem acontecer durante a isquemia cerebral. O acrônimo B.E.F.A.S.T. (*Balance, Eyes, Face, Arm, Speech, Time*) representa os sintomas de perda de equilíbrio, alterações na visão, queda facial, fraqueza nos braços e dificuldade na fala e, ao apresentar esses sintomas, o indivíduo deve rapidamente ser encaminhado ao hospital. Fonte: Elaborado pela autora (2025).

A determinação do início dos primeiros sintomas do AVCI até o paciente ser encaminhado para possíveis tratamento no hospital é de extrema importância nesta doença. Na década de 1990,

foi introduzido o princípio de “*Time is brain*” para enfatizar a intervenção rápida e evitar danos aos neurônios no local da isquemia (GOMEZ, 1993). Desde a criação deste termo, diversas linhas de pesquisas têm mostrado que múltiplos fatores contribuem na gravidade do dano isquêmico, e a janela terapêutica para o tratamento do AVCI é maior do que os pesquisadores haviam identificado anteriormente (GOMEZ, 2018). Essa doença é sensível ao tempo de intervenção, assim, estudos clínicos recentes mostram que os tratamentos devem ser realizados dentro de 24 horas após o início dos sintomas, com o objetivo de obter desfechos favoráveis aos pacientes (SAINI *et al.*, 2021).

As terapias mais comuns no tratamento do AVCI são a trombólise intravenosa e Trombectomia Mecânica (TM). A trombólise intravenosa dissolve os componentes celulares do trombo a partir da enzima plasmina, que é catalisada pelo ativador de plasminogênio tecidual (tPA) (JILANI; SIDDIQUI, 2023). Enquanto, a TM é um procedimento de recuperação endovascular, no qual um cateter é inserido no vaso sanguíneo até o sítio de oclusão do trombo. Este cateter alcança o coágulo do paciente, desobstruindo o fluxo sanguíneo. (Figura 2). Esse procedimento envolve principalmente o uso de *stent retrievers* para a captura do trombo e técnicas de aspiração distal, sendo que pode ocorrer variações e diferentes combinações de métodos para este procedimento (MUNOZ *et al.*, 2022). A composição histológica do trombo pode influenciar no procedimento da TM e na captura do coágulo no vaso sanguíneo, assim como na recanalização, resistência à recuperação e potencial trombolítico (JOLUGBO; ARIËNS, 2021). Desta forma, o estudo histopatológico dos coágulos pode contribuir para a seleção mais precisa de tratamentos endovasculares, favorecendo, assim, a reversão da condição patológica nos pacientes.

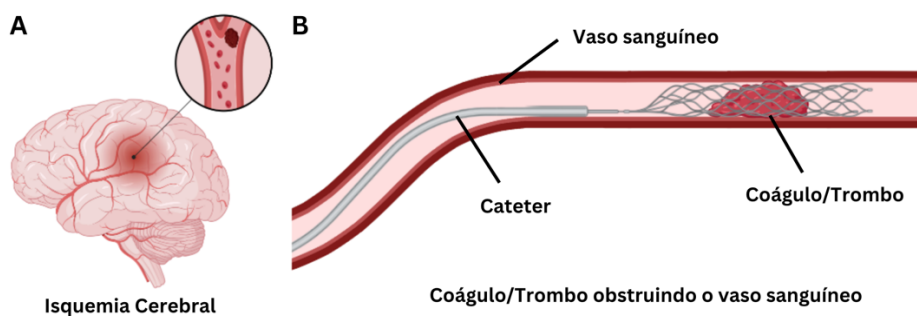


Figura 2. Trombo retirado pelo procedimento de Trombectomia Mecânica. [A] Isquemia cerebral causada pela presença de um coágulo no vaso sanguíneo, comprometendo o fluxo de sangue. [B] Catéter ligando-se ao coágulo para a retirada do trombo durante o procedimento da TM. Fonte: Elaborado pela autora (2024).

Os pacientes de AVCI são selecionados principalmente de acordo com o local de oclusão (circulação anterior ou posterior), tempo de início do AVCI (janela de 6 a 12 horas) e carga de infarto aceitável ($\text{ASPECTS} \geq 6$ ou volume de infarto < 50 mL) (JADHAV *et al.*, 2021). Alguns pacientes não são elegíveis para TM ou trombólise, mas têm possibilidade de receber terapias antiplaquetárias, que podem minimizar os riscos de recorrência dos AVCI e melhorar os desfechos clínicos (HOLLIST *et al.*, 2021). A adequação de pacientes com AVC isquêmico para o procedimento de trombectomia mecânica (TM) tende a aumentar nos próximos anos, com o objetivo de incluir um maior número de pacientes. Isso poderá ser possível por meio da redução da necessidade de exames de imagem avançados, abrangendo também casos como infartos maiores e oclusões mais distais (SHETH, 2023).

O AVCI pode ser o resultado de diversos eventos vasculares, como embolismo de origem cardíaca, oclusão de pequenos vasos cerebrais e aterosclerose afetando a circulação no cérebro. Ainda, a isquemia cerebral causada pelo embolismo cardíaco pode levar a casos mais graves de AVCI e com alta prevalência em diversos países (MAIDA *et al.*, 2020). Os principais fatores de risco do AVC são hipertensão, diabetes mellitus, tabagismo e hiperlipemia (ou dislipidemia), obesidade, dieta pobre em nutrientes e falta de atividades físicas (GUZIK; BUSHNELL, 2017).

Os determinantes genéticos de fatores de coagulação podem influenciar a patogênese do AVCI, como os fatores XI e VII e XI (Figura 3). O fator VII é importante na formação da fibrina, que está diretamente ligada na formação do trombo (VRIES *et al.*, 2019), enquanto o fator XI está envolvido na propagação e estabilização do trombo e pode ser um possível alvo para a redução do risco de AVCI cardioembólico (GILL *et al.*, 2018).

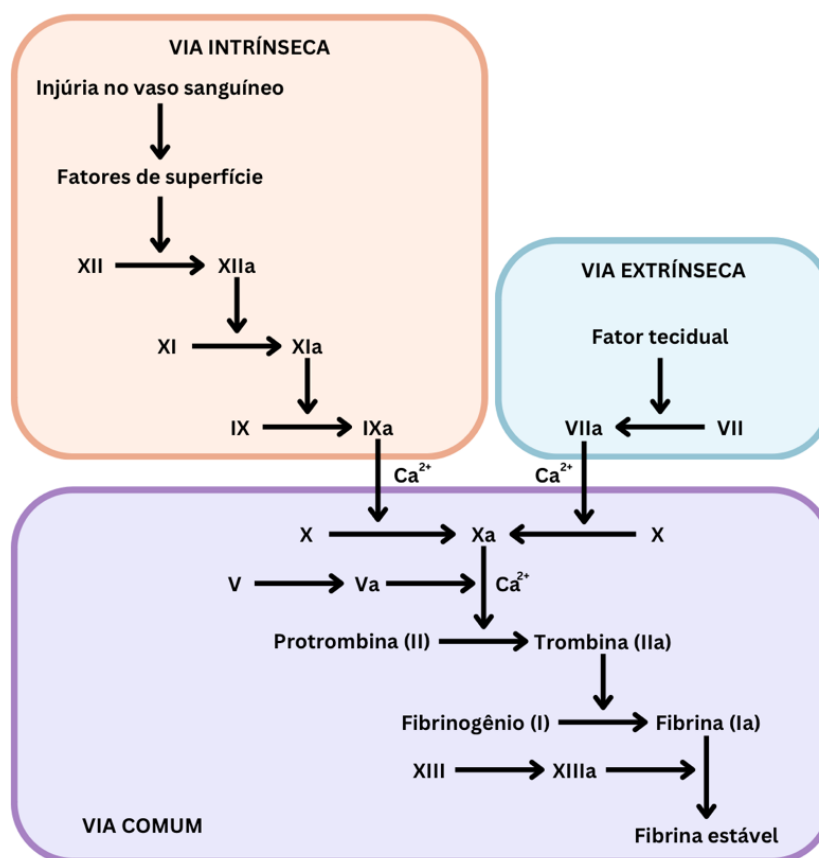


Figura 3. Cascata de coagulação. [1] A **via intrínseca** começa com injúrias nos vasos sanguíneos, que externalizam os fatores de superfície (ex: colágeno) e, por sua vez, ativam os fatores XII, XI e IX. Os fatores de coagulação VIIa e IXa, junto com íons de cálcio (Ca^{2+}), ativam o fator X. [2] A **via extrínseca** inicia por tecidos danificados (fator tecidual), ativando o fator VII. [3] Na **via comum**, um complexo com fator V ativado e íons de Ca^{2+} é formado com a ativação do fator X, convertendo a protrombina (fator II) em trombina (fator IIa). A trombina atua na ativação do fibrinogênio (fator I) em fibrina (fator Ia), que é instável. Ao ser ligada com o fator XIII ativado, a fibrina passa a ser estável. Fonte: Elaborado pela autora (2025).

Terapias anticoagulantes são indicadas para prevenir ou tratar a formação de trombos na corrente sanguínea. A inibição do fator XI é uma das estratégias mais utilizadas nestes casos devido à sua ampla contribuição para hemostasia e consolidação do coágulo (GRECO *et al.*, 2023). A cascata de coagulação, e consequentemente a formação do trombo, pode também ser regulada por inibidores plasmáticos e sistema fibrinolítico. A fibrinólise é a destruição da fibrina e, portanto, degradação do coágulo sanguíneo (Figura 4). Para isso, ocorre a ativação do plasminogênio em plasmina, que por sua vez, cliva a fibrina em produtos da degradação da fibrina (PDF), que podem ter funções imunomodulatórias e quimiotáticas (KANJI *et al.*, 2021). Assim, a fibrinólise é

altamente controlada por uma série de cofatores, inibidores e receptores e pode auxiliar na remoção do trombo no vaso pela degradação da fibrina (CHAPIN; HAJJAR, 2015).

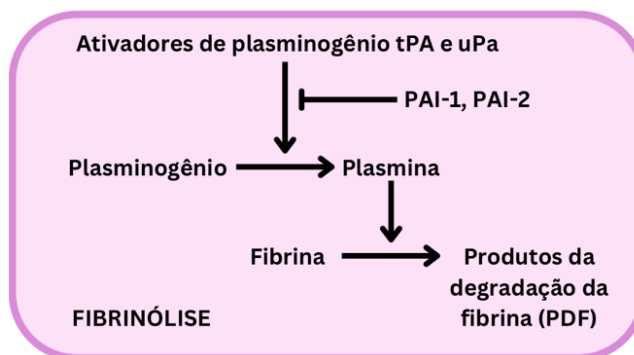


Figura 4. Fibrinólise. O plasminogênio é ativado por tPA (ativador de plasminogênio do tipo tecidual) e uPA (ativador de plasminogênio do tipo uroquinase), formando a plasmina, que atua na degradação da fibrina em fibrinopeptídeos, denominados de produtos da degradação da fibrina (PDF). Os ativadores de plasminogênio podem ser inibidos pelos Inibidores do Ativador de Plasminogênio do tipo 1 (PAI-1) e tipo 2 (PAI-2). Fonte: Elaborado pela autora (2025).

A contração, também denominada retração, do coágulo sanguíneo ocorre durante a hemostase normal e trombose, pode contrair e diminuir o tamanho do trombo para restaurar a circulação local, deixar o coágulo mais rígido e denso, dificultando sua retirada por procedimentos terapêuticos (ARIËNS, 2024). Essa contração pode ser promovida por plaquetas ativadas e compactação da rede de fibrina e dos eritrócitos, resultando na redistribuição da fibrina e plaquetas em direção à periferia do coágulo (LITVINOV; WEISEL, 2023). Por causa desta dualidade e complexidade, a contração ainda é pouco entendida e pode influenciar diretamente a atividade do trombo e desfechos clínicos.

1.2 Componentes do Trombo

Os trombos recuperados de pacientes com AVCI são altamente heterogêneos, sendo compostos principalmente de eritrócitos, fibrina, plaquetas e leucócitos. Análises histológicas mostram que cerca de 59% do coágulo é composto por fibrina e plaquetas, seguido de 40% de eritrócitos e 1% de leucócitos, enquanto a análise de imuno-histoquímica, utilizando o anticorpo anti-CD61, mostra no coágulo cerca de 68% de plaquetas (BOODT *et al.*, 2021).

O coágulo pode ser classificado em dois tipos principais: vermelho ou branco. Os vermelhos são constituídos principalmente por eritrócitos e menor quantidade de fibrina, diferentemente os brancos são ricos em fibrina e pobres em eritrócitos. Os trombos ricos em fibrina (brancos), comparados aos trombos ricos em eritrócitos (vermelho), podem dificultar a recanalização durante a TM, resultando em procedimentos endovasculares mais longos e piores desfechos clínicos (JOLUGBO; ARIËNS, 2021).

A composição histológica do trombo de AVCI pode variar dependendo do seu estágio de formação e etiologia. Com o trombo permanecendo no vaso sanguíneo ao longo do tempo, seus constituintes sofrem alterações, como a diminuição da permeabilidade do vaso e quantidade de eritrócitos, aumento da deposição de fibrina e resistência à trombólise (Figura 5) (JOUNDI *et al.*, 2021). Além disso, o coágulo pode apresentar regiões com componentes diferentes, isto é, o mesmo trombo possui regiões ricas em eritrócitos, pouca fibrina e plaquetas e regiões excassas em eritrócitos, ricas em fibrinas e agregados plaquetários (STAESSENS; MEYER, 2020). A quantidade de fibrina aumenta gradualmente, enquanto a de eritrócito diminui, resultando em maior rigidez do trombo e, conseqüentemente, diminuição da eficácia aos possíveis tratamentos de AVCI, como TM e trombólise (BOODT *et al.*, 2021).

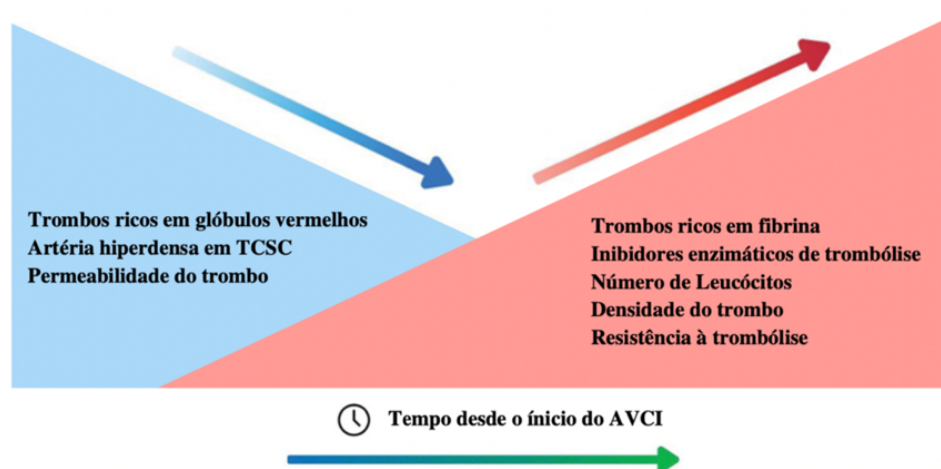


Figura 5. Mudanças dinâmicas dos trombos dependentes do tempo no AVCI. Alterações que o trombo sofre com sua permanência no organismo. A sigla TCSC corresponde à técnica de tomografia computadorizada sem contraste, exame realizado em pacientes com AVCI para observar a oclusão do vaso sanguíneo cerebral que está ocasionando a doença. Fonte: Adaptado de Joundi *et al.* (2021).

1.2.1 Fibrina

A partir da ativação da cascata de coagulação e conversão do fibrinogênio sob a ação da enzima trombina, é formada a proteína fibrina. Ela é essencial na hemostase, tratamento de feridas, inflamação e angiogênese. Em um indivíduo saudável, há equilíbrio entre a coagulação sanguínea (conversão de fibrinogênio em fibrina) e fibrinólise (degradação proteolítica do coágulo), a fim de evitar sangramento excessivo e formação de trombos nos vasos (WEISEL; LITVINOV, 2017). A renovação e rearranjo da fibrina não necessitam de digestão proteolítica para ocorrer, levando à mudanças significativas no diâmetro da fibrina e na estrutura do coágulo. Com a ativação do fator de coagulação XIII, as redes de fibrina tornam-se mais rígidas e resistentes à futuras modificações (CHANDRASHEKAR *et al.*, 2018).

Durante a formação da fibrina, protofibrilas e pequenas fibras se aglomeram para formar fibrinas mais retas e semelhantes à bastonetes, diminuindo progressivamente o diâmetro da fibra. Enquanto, durante a fibrinólise, estas fibras ficam progressivamente mais desagregadas, difusas e curvas (COLLET *et al.*, 2003). As protofibrilas são densamente compactadas e conectadas no centro do coágulo e se tornam espalhadas e frouxamente conectadas em direção à periferia (LI *et al.*, 2017). Dessa forma, a fibrina é um importante constituinte do trombo, sendo que sua quantidade e distribuição são parâmetros de classificação do coágulo e podem influenciar sua estabilidade, embolização e quebra.

1.2.2 Plaquetas

As plaquetas são produzidas por megacariócitos e são essenciais na hemostase e formação de coágulos sanguíneos. Elas são células altamente responsivas e secretoras, podendo liberar fatores de crescimento, citocinas e fatores de coagulação (MEIJDEN; HEEMSKERK, 2018). Após injúria vascular, as plaquetas se prendem em componentes subendoteliais expostos, são ativadas e formam um tampão hemostático para evitar a perda excessiva de sangue no local. No entanto, a atividade não controlada das plaquetas pode levar à formação de trombos no vaso e bloqueio da corrente sanguínea, como no caso de doenças tromboembólicas (BENDER; PALANKAR, 2021).

A adesão plaquetária se inicia pela ligação do seu complexo glicoproteína (GP) Ib-IX-V ao fator de von Willebrand (vWF) no endotélio danificado, permitindo a interação entre o receptor de colágeno GPVI e seu ligante para mediar a ativação das plaquetas. Este processo é intensificado

pela trombina e mediadores secundários, como tromboxano A2 (NIESWANDT *et al.*, 2011). A hemostase primária é determinada pela injúria inicial do vaso sanguíneo, seguida pela ligação das plaquetas ao vWF e ao colágeno subendotelial. Posteriormente, na hemostase secundária, plaquetas subsequentes são ativadas pela sua interação com os receptores de superfície e ativação do sistema de coagulação, em que o fator VII se liga ao fator tecidual (WINTER *et al.*, 2017). Dessa forma, por atuarem principalmente na hemostase e trombozes, o controle das atividades plaquetária e de seus receptores tem sido um importante alvo no desenvolvimento de futuros tratamentos para doenças vasculares, como o AVCI.

1.2.3 Eritrócitos

A hemostasia e trombose podem, também, ser controladas pelos eritrócitos, ou hemácias, que são os componentes de maior quantidade na corrente sanguínea e podem agir como fatores pró-coagulantes ou pró-trombóticos. Os eritrócitos podem contribuir na viscosidade do sangue, em que o aumento da viscosidade leva à diminuição da velocidade do fluxo sanguíneo, promovendo o acúmulo de plaquetas na parede e contribuindo na interação entre plaquetas e células endoteliais (WEISEL; LITVINOV, 2019). Durante o estresse oxidativo causado pela trombose, os eritrócitos produzem altas quantidades de espécies reativas de oxigênio (ROS) intracelular, enquanto outras células liberam ROS extracelulares na circulação sanguínea, podendo ser absorvidas e acumuladas nos eritrócitos. Este quadro oxidativo é capaz de alterar a estrutura da membrana da célula, levando ao comprometimento da função e lise dos eritrócitos, ligação às células endoteliais do vaso sanguíneo, ativação plaquetária e fatores de coagulação. Assim, estes eritrócitos modificados podem aderir à parede do vaso e contribuir na formação do trombo (BETTIOL *et al.*, 2022).

Durante a contração do trombo, os eritrócitos podem sofrer alterações morfológicas e apresentar formato poliedral, chamados de poliedrócitos, que ocorre devido à força de compactação dos eritrócitos pela fibrina e plaquetas. Esta mudança conformacional foi primeiramente descrita por Gottlob *et al.* (1971), pesquisadores que observaram a forma irregular dos eritrócitos após a contração e retração do coágulo. Os poliedrócitos podem aumentar a estabilidade e rigidez do trombo, podendo ser um importante fator de interferência durante a remoção do trombo por trombólise ou TM (LEONG *et al.*, 2017). Esta morfologia é uma deformação natural que ocorre no eritrócito durante a contração do trombo por plaquetas ativadas

e fibrina (TUTWILER *et al.*, 2018). Assim, os eritrócitos são componentes importantes e devem ser estudados mais profundamente para entender melhor o funcionamento dos coágulos.

1.2.4 Leucócitos

A coagulação sanguínea e ativação plaquetária podem ser diretamente influenciadas pela atividade dos leucócitos, que produzem citocinas moduladoras de moléculas pró-coagulantes e adesivas em células endoteliais vasculares. Ainda, os leucócitos podem ser recrutados ao sítio trombótico por citocinas e quimiocinas liberadas por plaquetas ativadas (SWYSTUN; LIAW, 2016). O recrutamento de leucócitos, principalmente neutrófilos, monócitos e macrófagos, para o sítio de oclusão é constante e possui alto impacto na patogênese da injúria vascular cerebral.

Os monócitos podem ser ativados e liberam citocinas pró-inflamatórias durante a inflamação, além de interagirem com plaquetas e células endoteliais, contribuindo para o desenvolvimento e agravamento da trombose. A atividade dos monócitos na trombose arterial tem sido pouco investigada (HAN *et al.*, 2023). Os monócitos e macrófagos são importantes na dissolução e recanalização dos trombos por secretarem diversos fatores, como fatores de crescimento angiogênicos, citocinas e quimiocinas que aumentam a neovascularização intratrombótica, facilitando a degradação de fibrina e colágeno (LU *et al.*, 2024).

Os neutrófilos, principalmente em resposta à patógenos, podem liberar Armadilhas Extracelulares dos Neutrófilos (NETs - *Neutrophil Extracellular Traps*), compostas por fitas de DNA descondensadas, histonas e proteínas granulares citoplasmáticas de neutrófilos (RADA, 2019). As NETS estão relacionadas com o nível de dano neurológico dos pacientes com AVCI. Com uma reperfusão prolongada, os pacientes apresentam desfechos mais favoráveis e menor quantidade de NETS nos trombos. Por estes componentes estarem diretamente associados com danos clínicos cerebrais, algumas terapias voltadas ao controle das NETS podem ser benéficas para a proteção neurológica (CHEN *et al.*, 2022). Apesar do aumento da quantidade de NETs estar diretamente relacionado com danos neurológicos e piores desfechos clínicos, elas ainda são essenciais na proteção do organismo contra patógenos externos e sua atividade não deve ser suprimida por completo (HERRE *et al.*, 2023).

No geral, os leucócitos são fundamentais no processo inflamatório, formação e resolução de trombos, podendo influenciar a adesão e agregação de outras células. Essas células liberam

citocinas e quimiocinas durante a inflamação e modulam a fibrinólise. No início da formação do coágulo, as células leucocitárias são recrutadas para o sítio de injúria do vaso após a adesão de plaquetas ao endotélio (MANDEL *et al.*, 2022). A atividade dos leucócitos, como ativação, adesão e transmigração é controlada pelas células endoteliais do vaso sanguíneo (KRÜGER-GENGE *et al.*, 2019).

1.3 Matriz Extracelular

A matriz extracelular (MEC) do vaso sanguíneo fornece uma barreira fibrosa estável entre as plaquetas e os fatores pró-trombóticos. A exposição das proteínas subendoteliais da matriz extracelular à circulação também inicia o acúmulo de plaquetas e a formação dos coágulos nos vasos sanguíneos após injúria vascular, sendo estas proteínas importantes no suporte e regulação desses eventos (WANG *et al.*, 2016).

As interações entre a MEC e hemostase podem ser mediadas pelos diferentes tipos de colágeno, que auxiliam na estabilidade e propriedades de adesão da membrana vascular. Os colágenos do tipo XV e XVIII recrutam células imunes para o sítio de injúria tecidual e os do tipo I, III, IV e VI interagem diretamente com receptores das plaquetas (MANON-JENSEN *et al.*, 2016). Ao ocorrer uma injúria vascular e exposição do colágeno, as plaquetas são aderidas ao vaso por meio de GPIb-V-IX e vWF ligado ao colágeno (NAVARRO *et al.*, 2021). As células imunes envolvidas na formação do coágulo sanguíneo expressam e liberam fatores fibrinolíticos e modulam a quebra da fibrina e modulam a resolução do trombo (Figura 6) (MUKHOPADHYAY *et al.*, 2019).

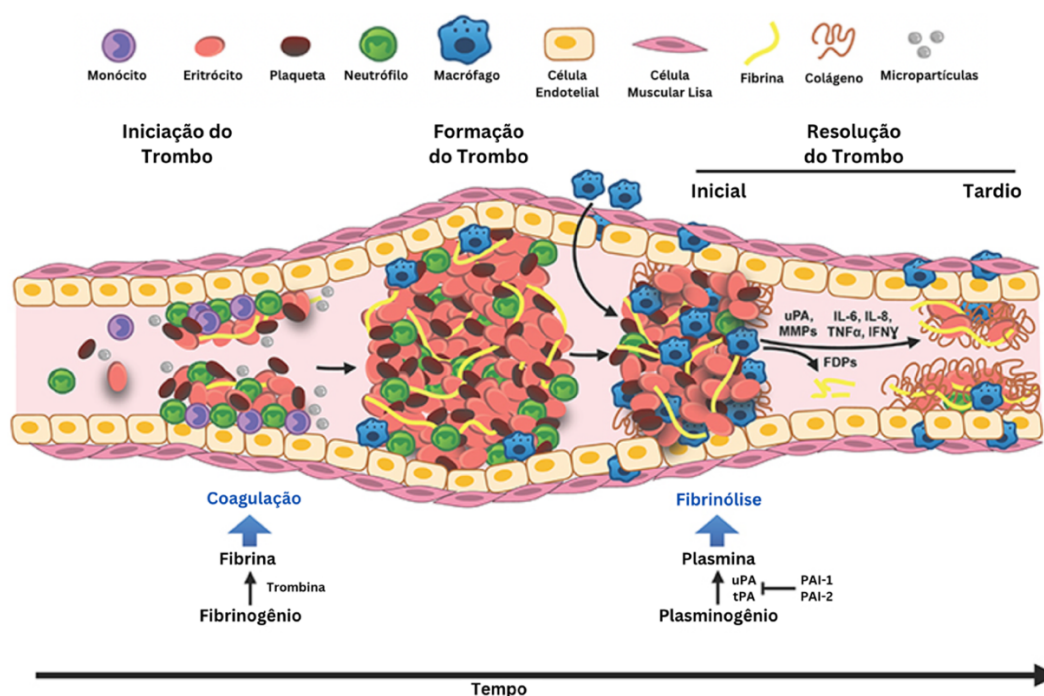


Figura 6. Células imunes na trombólise. A trombólise pode iniciar pela estagnação das células no vaso sanguíneo ou dano endotelial. Neutrófilos e plaquetas ligam-se ao endotélio vascular ativado e iniciam a formação, crescimento do trombo e deposição de fibrina. Neutrófilos infiltrados no trombo modulam a geração de plasmina e metaloproteinases da matriz (MMPs), auxiliando a fibrinólise e remodelação do colágeno para a resolução do trombo. No início da resolução do trombo, a fibrinólise gera FDPs, as fibrilas de colágeno aparecem e as células imunes produzem citocinas inflamatórias e proteases. Com a permanência do trombo no vaso, a taxa de fibrinólise diminui, a deposição de colágeno no trombo aumenta e ocorre a remodelação da MEC por meio de MMPs secretadas por macrófagos, restaurando o fluxo sanguíneo. Fonte: Adaptado de Mukhopadhyay *et al.* (2019).

1.4 Inflamação

O processo inflamatório iniciado pela formação do trombo de AVCI pode intensificar ou combater o dano secundário, e atividades contrárias devem estar em constante equilíbrio no organismo. A inflamação contínua resulta no recrutamento de leucócitos, principalmente neutrófilos, ativação de plaquetas e cascatas de coagulação (ANSARI; GAVINS, 2021) (Figura 7). Esta interação entre leucócitos e plaquetas pode produzir mediadores pró-inflamatórios e pró-trombóticos, sendo importante na formação dos coágulos cerebrais. Ainda, durante a isquemia, as células imunes podem produzir ROS, que estimulam células endoteliais e resultam em estresse oxidativo (PAWLUK *et al.*, 2020). Entretanto, a inflamação também é essencial no reparo e

recuperação funcional do cérebro a partir do aumento de fatores pró-coagulantes e inibição das vias anticoagulantes e atividades fibróticas (JIN *et al.*, 2013). Desta forma, estas características antagônicas e suas possíveis complicações podem contribuir pelo avanço terapêuticos de doenças inflamatórias, como o AVCI.

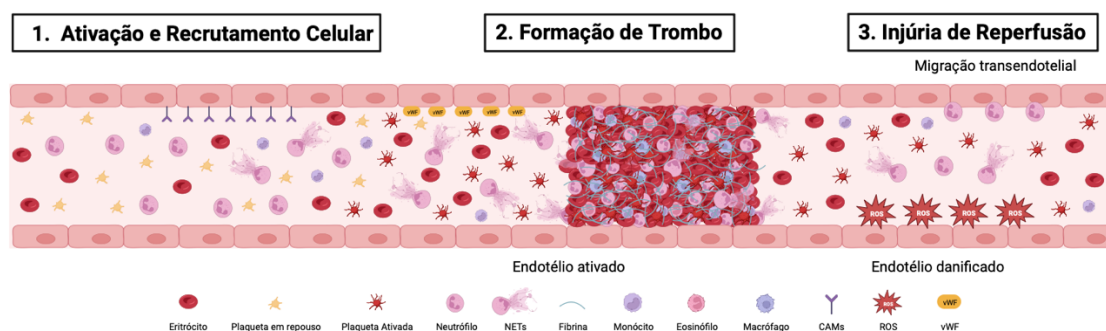


Figura 7. Interação de neutrófilos e plaquetas na patogênese do AVC. [1] Ativação e Recrutamento Celular. Na trombose e inflamação crônica, há aumento da ativação e recrutamento de neutrófilos e plaquetas nos vasos sanguíneos cerebrais. Posteriormente, ocorre ativação e liberação de moléculas de adesão celular (CAMs) e os neutrófilos ativados produzem diversos mediadores pró-trombóticos, como NETs e Catepsina G. **[2] Formação do Trombo.** Ativação e recrutamento resultam no acúmulo constante de neutrófilos, plaquetas e eritrócitos e na ativação da cascata da coagulação por inibidores da via de fator tecidual (TPPI). **[3] Injúria de Reperfusão.** A reperfusão resulta na produção excessiva de mediadores pró-inflamatórios e pró-trombótico no sítio de oclusão do vaso sanguíneo. Os neutrófilos produzem ROS, que danificam o endotélio e aumentam a migração transendotelial dos neutrófilos. Injúrias adicionais do tecido ocorrem devido à ativação contínua de plaquetas e do sistema complemento. Fonte: Adaptado de Ansari e Gavins (2021).

A injúria de reperfusão, também chamada de Isquemia/Reperfusão (I/R), causada no tecido vascular após a formação e resolução da isquemia pode levar à migração transendotelial de neutrófilos e produção de ROS. A interação entre os neutrófilos e células endoteliais é mediada por uma série de moléculas de adesão, que garante a adesão dos neutrófilos ao endotélio (JORDAN *et al.*, 1999). Ainda, as ROS causam estresse oxidativo, que promove o dano endotelial, dano no DNA e respostas inflamatórias locais, podendo resultar em mortes celulares (WU *et al.*, 2018). Estudos farmacológicos demonstram que a proteína anti-inflamatória Anexina A1 (ANXA1) atua ativamente no processo de I/R, principalmente na inibição da atividade de células inflamatórias (ANSARI *et al.*, 2018). Assim, é de extrema relevância investigar o papel da

ANXA1 e avaliar seu envolvimento no processo isquêmico e na formação dos coágulos sanguíneos.

1.5 Proteína Anexina A1

A ANXA1 pertence à superfamília das anexinas que se ligam aos fosfolipídios de uma forma dependente de cálcio. Esta proteína é capaz de mimetizar a ação anti- inflamatória dos glicocorticoides, afetando diversos componentes do processo inflamatório, inibindo a síntese de eicosanóides e atividade da enzima fosfolipase A2 (PLA2) (FLOWER, 1988; OLIANI; DAMAZO; PERRETTI, 2002). As anexinas são compostas de dois domínios principais: uma pequena região N-terminal responsável pela atividade anti-inflamatória e anti-proliferativa e um domínio central altamente conservado (Figura 8) (MUNN; MUES, 1986; LIZARBE *et al.*, 2013). A região N-terminal apresenta o peptídeo mimético Ac₂₋₂₆, que é capaz de reproduzir a atividade biológica da proteína Anexina. Outras funções foram atribuídas à ANXA1 no organismo, como fagocitose, aumento e/ou redução da proliferação e apoptose (Figura 9) (LIM; PERVAIZ, 2007).

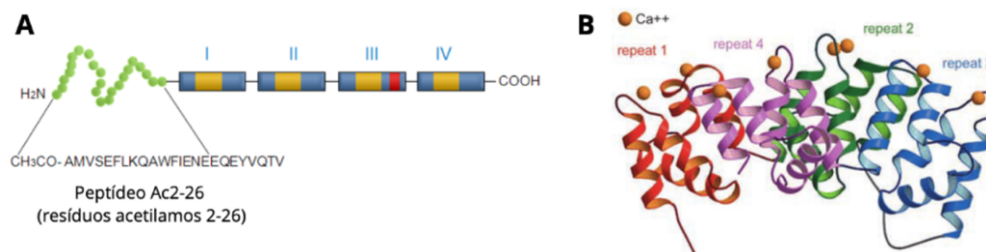


Figura 8. Representação esquemática da ANXA1. [A] Estrutura primária da proteína anti-inflamatória, com destaque do sítio anti-inflamatório na região N-terminal (peptídeo Ac2-26). [B] Ilustração do arranjo tridimensional da proteína. Fonte: Adaptado de Gavins (2012).

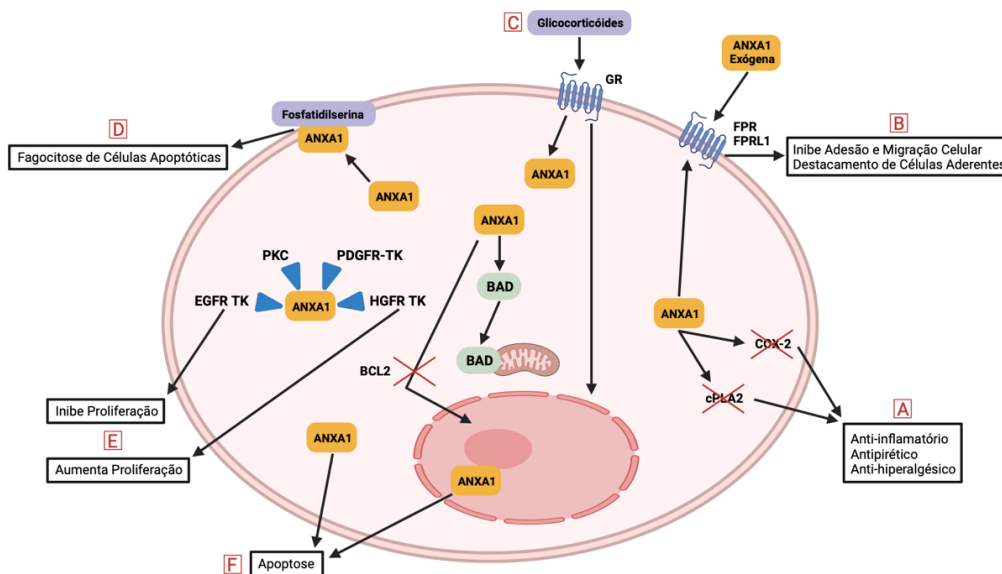


Figura 9. Ações biológicas da ANXA1. [A] Inibição da atividade da fosfolipase A2 citosólica (cPLA2) e cicloxigenase-2 (COX-2) causa efeito anti-inflamatório, antipirético e anti-hiperalgésico. [B] ANXA1 exógena atua sobre o receptor de formil peptídeo (FPR) e lipoxina A4 (FPRL1/ALX/FPR2), inibindo a adesão, migração celular e desprendimento de células aderentes. [C] Aumento da expressão de ANXA1 com por glicocorticóides pelo receptor de glicocorticoide (GR), que contribui para a sua atividade anti-inflamatória. Os GRs induzem a fosforilação rápida e translocação da ANXA1 para membrana celular. [D] ANXA1 é recrutada para a superfícies celular, liga-se à fosfatidilserina e intercede no engolfamento de células apoptóticas. [E] ANXA1 é fosforilada para aumentar ou diminuir a proliferação por quinases, como tirosina quinase EGF-R, proteína quinase C (PKC), tirosina quinase do receptor do fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGFR-TK) e tirosina quinase do receptor do fator de crescimento de hepatócitos (HGFR-TK). [F] ANXA1 induz a apoptose pela indução da desfosforilação da BAD, permitindo que a BAD transloque para as mitocôndrias, ou pela translocação da ANXA1 para o núcleo, que pode ser inibida por BCL2. Fonte: Adaptado de Lim e Pervaiz (2007).

O receptor 2 do peptídeo N-formil (FPR2) é acoplado à proteína G e está localizado na superfície de diversas células. Este receptor é capaz de ligar outros peptídeos ou mediadores lipídicos estruturalmente distintos a fim de promover ou inibir a inflamação, e tem sido alvo de terapias farmacológicas no tratamento de doenças inflamatórias (ZHUANG *et al.*, 2022). A interação entre o peptídeo Ac2-26 da ANXA1 e o receptor FPR2 mostra ativar a proteína quinase ativada por monofosfato de adenosina (AMPK) e, então, regula o processo inflamatório cerebral (XU *et al.*, 2021). O FPR2 mostra regular a atividade anti-inflamatória da proteína ANXA1 e os glicocorticóides podem mobilizar a ANXA1 na superfície celular, onde o FPR2 está localizado (SAWMYNADEN; PERRETTI, 2006).

Desse modo, as pesquisas sobre a ANXA1 têm melhorado na compreensão do papel dessa proteína nos processos inflamatórios. Contudo, os mecanismos moleculares que permitem à ANXA1 regular as respostas celulares em tais processos ainda não foram totalmente elucidados. Além disso, são poucos os estudos que abordam a função anti-inflamatória da ANXA1 em doenças vasculares e neuroinflamatórias. Com essas considerações, nossa proposta do presente trabalho foi avaliar a composição do trombo em relação ao tempo de recanalização da TM, a organização celular e os componentes dos trombos. Além disso, consideramos relevante definir o papel da proteína ANXA1 no contexto de isquemia.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar a organização histopatológica de trombos de pacientes com Acidente Vascular Cerebral Isquêmico submetidos ao procedimento de Trombectomia Mecânica.

2.2 Objetivos Específicos

1. Classificar os trombos em vermelhos ou brancos dependendo das diferenças histológicas;
2. Investigar a influência do número de passagens endovasculares durante o processo de Trombectomia Mecânica na organização e composição histológica, considerando os grupos com 1, 2-3 e +4 passagens do catéter;
3. Quantificar a expressão de plaquetas e leucócitos nos trombos de AVCI para entender a distribuição desses componentes em contextos isquêmicos;
4. Analisar a presença de colágeno na matriz extracelular do vaso sanguíneo nos trombos de pacientes com AVCI;
5. Avaliar a expressão da proteína Anexina A1 nas células do trombo de AVCI;

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Pacientes

Pacientes (n = 55) avaliados e referenciados ao Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP na área de Neurocirurgia Vascular e Endovascular, pelos seguintes critérios para intervenção.

Critérios de Inclusão

1. Pacientes com diagnóstico de AVCI com até 8 horas após início dos sintomas;
2. Pacientes inelegíveis para tratamento trombolítico endovenoso;
3. Pacientes que receberam terapia trombolítica sem melhora clínica expressiva após o início da infusão do tPA (após o início da infusão do rt-PA, se não houver melhora clínica imediata significativa, definida com melhora ≥ 8 pontos no NIHSS);
4. Pacientes acima de 18 anos, sem limite superior de idade.

Critérios de Exclusão

1. Conhecida diátese hemorrágica, deficiência de fator de coagulação ou uso de anticoagulante oral com Relação Normalizada Internacional (RNI) $>3,0$;
2. Contagem de plaquetas na admissão $< 30.000/\mu\text{L}$;
3. Doença avançada, grave ou terminal que tenha uma expectativa de vida < 1 ano;
4. História de alergia ao meio de contraste com risco de vida (mais que rash cutâneo);
5. Hipodensidade na TCSC com escore ASPECTS <6 ou RM-DWI com ASPECTS <5 . O uso de TC Perfusão ou RM Perfusão são opcionais. Se utilizar a CTP ou perfusão por RM, serão excluídos pacientes que apresentarem núcleo isquêmico > 70 ml e relação entre a perfusão e o núcleo isquêmico (mismatch) $< 1,8$ e o volume de mismatch < 15 ml;
6. Pacientes que apresentarem “perfil maligno” de circulação colateral (ausência de colaterais na angioTC);
7. Evidência de hemorragia na TC ou na RM (a presença de microsangramentos – *microbleeds* - é permitida);
8. Significante efeito de massa com desvio de linha média;
9. Evidência de oclusão carótida ipsilateral, alto grau de estenose ou dissecção arterial no segmento extracraniano ou petroso da carótida interna que não possa ser tratado ou que

não permitirá acesso ao trombo intracraniano ou excessiva tortuosidade de vasos cervicais que impeçam a liberação/posicionamento do dispositivo de tratamento;

10. Pacientes com oclusões em múltiplos territórios vasculares (por exemplo, circulação anterior bilateral ou circulação anterior e posterior);
11. Evidência de tumor intracraniano (exceto pequeno meningioma).

3.2 Procedimento de Trombectomia Mecânica

O procedimento de TM foi realizado no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP, preconizando as seguintes técnicas:

1. Administração de sedação ou anestesia geral, conforme o caso, para garantir o conforto e a segurança do paciente. Sedação é preferida à anestesia geral;
2. Anticoagulação - permitidas apenas infusões de solução salina heparinizada para lavagem em pacientes que receberam rtPA endovenoso e medicamentos antiplaquetários de acordo com as diretrizes padrão da instituição;
3. Punção da artéria femoral comum, com passagem do introdutor valvulado, fio guia e cateteres;
4. Utilizar radiografia angiográfica, determinar a localização e o tamanho da área a ser tratada. (Angiografia de base);
5. Selecionar o dispositivo *stent-retriever* e/ou de tromboaspiração apropriados de acordo com a recomendação nas instruções de uso;
6. Realizar o procedimento de cateterização com o dispositivo *stent-retriever* e/ou de tromboaspiração conforme definido nas instruções de uso fornecidas em cada embalagem do dispositivo. O uso de um cateter guia de balão e/ou aspiração local é obrigatório;
7. Obter resultados angiográficos, expressos em escores TICI (*trombolysis in cerebral infarction*), imediatamente após a implantação do dispositivo e depois da recuperação do dispositivo. Registrar o tempo de implantação/recuperação para cada passagem;
8. Recuperar o coágulo adicional com o dispositivo, caso necessário. Se o paciente tiver uma oclusão qualificada, ou seja, envolvendo o T carotídeo, segmento M1, em tandem, e após a revascularização da lesão qualificada houverem oclusões residuais situadas em regiões

mais distais do que a oclusão qualificada (M2 ou mais distal), a extensão em que essas oclusões distais serão tratadas com o *stent-retriever* e/ou de tromboaspiração ficará a critério do time de tratamento;

9. Obter resultados angiográficos finais (após a realização de passagem final e remoção do dispositivo), de preferência utilizando as mesmas projeções e taxas de injeção que a angiografia de base.

3.3 Considerações Éticas

Todos os participantes leram e assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido e, o presente estudo foi avaliado e aprovado pelo Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP; Número do Parecer: 3.842.019; CAAE: 27126619.8.1001.5440.

3.4 Fixação e Processamento Histológico

Os fragmentos de trombo dos pacientes submetidos à TM foram coletados após o procedimento e fixados em paraformaldeído tamponado a 4%, por 48 horas em temperatura ambiente, seguidos pela desidratação em série crescente de etanol, diafanização em xilol e inclusão em parafina (Merck, Darmstadt, Germany). O material foi cortado na espessura de 4µm pelo micrótomo (Leica RM2265) para avaliações histológicas (coloração Hematoxilina-Eosina) e imuno-histoquímicas. As análises e fotomicrografias foram feitas no microscópio óptico de campo claro (AxioskopMotplus II, Zeiss) do Laboratório de Imunomorfologia (IBILCE - UNESP), e no microscópio confocal LSM780 NLO (Carl Zeiss AG, Germany) do Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Fotônica Aplicada à Biologia Celular (INFABIC - UNICAMP).

Para fins comparativos das análises histopatológicas, as amostras obtidas dos pacientes após o procedimento de TM foram divididas em três grupos. O primeiro grupo inclui os coágulos com apenas 1 passagem (n=30) durante o procedimentos de TM. O segundo grupo representa os trombos com 2 a 3 passagens (n=17) e o último inclui amostras com + 4 passagens (n=8).

3.5 Análises Imuno-histoquímicas

As imunomarcações foram analisadas nos fragmentos dos trombos com o anticorpo primário para a proteína ANXA1 (ab33061, Abcam, UK), plaquetas CD42b (ab183345, Abcam,

UK), MPO (ab9535, Abcam, UK) e o anticorpo secundário *Goat pAb to Rb igG (HRP polymer)* (ab214880, Abcam, UK), de acordo com o protocolo de cada fabricante. Os fragmentos foram preparados em lâminas silanizadas (StarFrost) e colocadas em estufa a 37°C por 2 horas e, em seguida (a) desparafinizados e hidratados; (b) incubados em tampão citrato de sódio de pH 6 para a recuperação antigênica por 10 min em panela de pressão e 10 min em temperatura ambiente; (c) lavados com PBS e deixados em solução com peróxido de hidrogênio por 30 min para o bloqueio da peroxidase endógena; (d) lavados com PBS por 5 min; (e) incubados em solução de *Goat Serum* a 3% em PBS, por 30 min em temperatura ambiente; (f) incubados em câmara úmida com o anticorpo primário *overnight* em anti-ANXA1 diluído na concentração de 1:200 em BSA 1%; por 1 hora e 30 min em anti-CD42b diluído na concentração 1:300 em *Goat Serum* a 1%; e por 1 hora e 30 min em anti-MPO diluído na concentração 1:200 em *Goat Serum* a 1%. (g) lavados com TPBS por 5 min; (h) incubados com o anticorpo secundário biotilado (kit Histostain SP Broad Spectrum HRP – Invitrogen); (i) lavados com PBS por 15 min; (j) imersos em complexo estreptavidina peroxidase conjugada, por 30 min; (k) lavados com TPBS por 5 min; (l) incubados em substrato diaminobenzidina (DAB) por 5 min em temperatura ambiente, no escuro (Kit DAB+CHROMOGEN DAKO); (m) lavados em água destilada, (n) contra-corados com Hematoxilina de Gill No.3; (o) montados com *DPX Mountant for histology*.

3.6 Análises Imunofluorescentes

A imunofluorescência foi realizada em amostras de trombos de AVCI no *Institute of Pharmaceutical Science, King's College London, UK*, para plaquetas utilizando os anticorpos primário CD42b (ab183345, Abcam, UK) e secundário fluorescente Alexa Fluor® 594 (407410, BioLegend, UK), de acordo com o protocolo do fabricante. As amostras foram preparadas em lâminas silanizadas (StarFrost) e, em seguida (a) desparafinizadas e hidratadas; (b) incubadas em tampão citrato de sódio de pH 6 para a recuperação antigênica por 10 min em panela de pressão e 10 min em temperatura ambiente; (c) com PBS por 5 min; (d) incubadas em solução de *Goat Serum* a 3% em PBS, por 30 min em temperatura ambiente; (e) incubadas em câmara úmida com o anticorpo primário por 1 hora e 30 min em anti-CD42b diluído na concentração de 1:200 em *Goat Serum* a 1%; (f) lavadas com TPBS por 5 min; (g) incubadas com o anticorpo secundário fluorescente Alexa Fluor® 594 (h) lavadas com TPBS por 5 min; (i) incubadas em DAPI na

concentração de 1:3000 em PBS por 1 min no escuro em temperatura ambiente; (j) lavadas em água destilada por 5 min; (k) montadas com *Fluoromount-G*®.

3.7 Microscopias Confocais Não-Lineares

O conceito da microscopia confocal foi desenvolvido a fim de corrigir a luz fora de foco a partir do uso de aberturas de *pinholes* ao lado da iluminação no mesmo plano de imagem conjugado (Figura 10) (ELLIOTT *et al.*, 2019). A microscopia óptica pode se distinguir em excitação linear (apenas um fóton) ou não linear. As técnicas não lineares são menos sensíveis à dispersão da luz e, assim, são capazes de gerar imagens de alta resolução (HELMCHEN; DENK, 2005). Além disso, as microscopias não-lineares não requerem marcações específicas para sua avaliação e, então, foram desenvolvidos alguns tipos de microscopias utilizando o princípio não-linear, como a Microscopia por Geração de Segundo-Harmônico e por Excitação de Dois-Fótons.

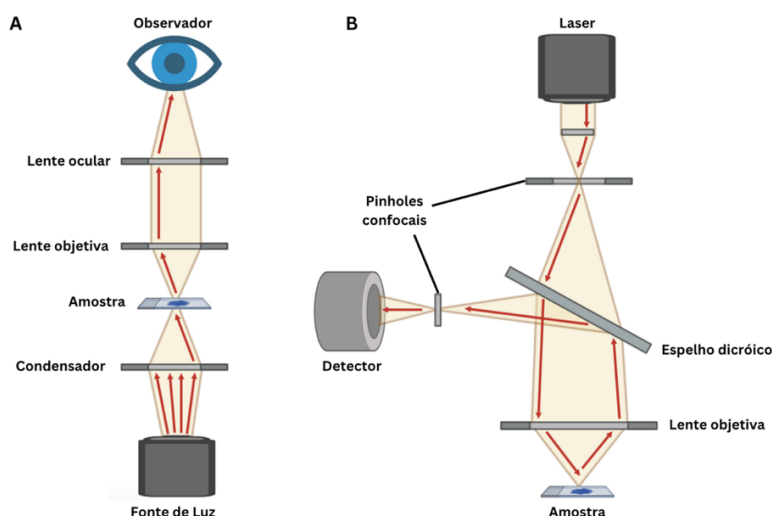


Figura 10. Microscopia de Luz e Confocal. [A] Funcionamento da microscopia de luz convencional. [B] Funcionamento da microscopia confocal. A fonte de luz é um laser, que passa por diversos *pinholes* confocais e espelhos dicróicos até chegar na amostra. Um *pinhole* é colocado na frente da fonte de luz para o ponto de luz ser focado na amostra pela lente objetiva. A segunda lente objetiva focaliza a amostra previamente iluminada no segundo *pinhole* em frente ao detector, rejeitando raios fora de foco e obtendo maior resolução da imagem. Fonte: Elaborado pela autora (2025).

3.7.1 Microscopia por Geração de Segundo Harmônico

A Geração de Segundo-Harmônico (SHG – *Second-Harmonic Generation*) combina a incidência de dois fótons de mesma frequência em uma amostra não-linear, resultando na emissão

de um fóton com o dobro da frequência inicial (Figura 11). A Microscopia por SHG tem sido aplicada em diversos materiais e ciências biomédicas principalmente por apresentar diversas vantagens em relação às microscopias fluorescentes, como não depender de um fluoróforo ou marcação específica para emitir sinal (o contraste ocorre pela autofluorescência da amostra), ausência de *photobleaching* e ocorre instantaneamente (não depende da taxa de repetição do laser) (AGHIGH *et al.*, 2023). Essas características da microscopia por SHG tornam a técnica interessante para analisar estruturas em nível macromolecular e supramolecular. Além disso, são utilizados comprimentos de onda de excitação próximos ao infravermelho, de 800 a 1000 nm, apropriado para analisar amostras de tecidos intactos devido à grande profundidade de penetração nas amostras (ROTH; FREUND, 1981).

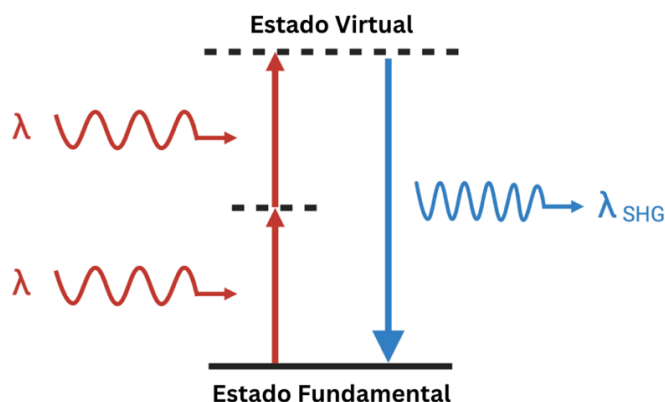


Figura 11. Geração de Segundo-Harmônico. Dois fótons de comprimento de onda λ (vermelho) atingem uma molécula da amostra e emite uma onda de comprimento $\lambda/2$ (azul), que possui metade do comprimento de onda inicial e, assim, esta onda emitida apresenta o dobro da frequência da onda inicial. Fonte: Elaborado pela autora (2025).

Os trombos selecionados para avaliação da presença de matriz/colágeno, em cortes histológicos corados com Hematoxilina/Eosina, foram preparados e analisados segundo Natal *et al.* (2019). A microscopia de SHG foi realizada em um sistema confocal Zeiss LSM 780-NLO usando uma objetiva 40x/1.3 na EC Plan-Neofluar no Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Fotônica Aplicada à Biologia Celular, da Universidade Estadual de Campinas, SP (INFABiC, Unicamp, SP). O comprimento de onda de excitação foi de 780nm e a potência do laser incidente na lente objetiva sobre o tecido foi de 140 mW, em polarização circular. Dois detectores foram

usados para capturar os sinais transmitidos e refletidos de SHG: o detector PMT (*photomultiplier tube detector*) e o NDD (*non-descanned detector*), respectivamente.

3.7.2 Microscopia de Excitação de Dois-fótons

A excitação de dois fótons (TPF – *Two Photon Fluorescence*) ocorre quando a soma de dois fótons é equivalente à energia necessária para a saída do fluoróforo de seu estado fundamental para o excitado e chegam simultaneamente à amostra (Figura 12) (DIASPRO *et al.*, 2005). Isto é, dois fótons atingem uma molécula de fluorescência da amostra e combinam suas energias para deixar a molécula em um estado excitado, assim, emitindo fluorescência.

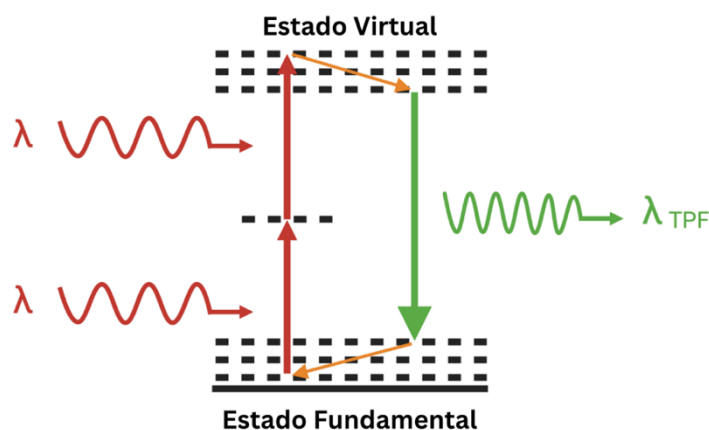


Figura 12. Excitação de Dois-Fótons. Absorção de dois fótons de comprimento de onda λ (vermelho) que excitam a molécula fluorescente a um estado excitado (laranja) e a fluorescência visível é emitida quando a molécula volta a seu estado fundamental (verde). Fonte: Elaborado pela autora (2025).

A Microscopia de Excitação de Dois-Fótons foi utilizada para detectar as regiões ricas em fibrina no trombo e quantificar a densidade deste componente a partir de cortes histológicos corados com Hematoxilina/Eosina e preparados segundo Natal *et al.* (2019). Assim, foi utilizado um sistema confocal Zeiss LSM 780-NLO usando uma objetiva de 40x/1.3 Na EC Plan-Neofluar no Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Fotônica Aplicada à Biologia Celular, da Universidade Estadual de Campinas, SP (INFABiC, Unicamp, SP). O comprimento de onda de excitação foi de 780nm e a potência do laser incidente na lente objetiva sobre o tecido foi de 140

mW, em polarização circular. O sinal foi capturado pelo detector NDD, principalmente devido à coloração da Eosina.

3.8 Classificação das Amostras

Os trombos foram classificados em brancos ou vermelhos decorrentes de sua composição histológica. As amostras com maior quantidade de fibrina e poucos eritrócitos foram consideradas como brancos e com menor deposição de fibrina e maior quantidade de eritrócitos, como vermelhas. A quantificação dos leucócitos foi feita a partir da média de 15 regiões aleatórias diferentes do trombo com aumento de 40x da lente objetiva do microscópio de campo claro.

3.9 Análise das Imagens

As imagens no Microscópio Campo Claro e Confocal foram processadas e analisadas no software *ImageJ/Fiji* versão 2.14.0/1.54f, programas desenvolvidos pelo *National Institute of Health* (NIH) e *Laboratory for Optical and Computational Instrumentation* (LOCI, Universidade de Winsconsin). As regiões ricas em fibrina (regiões de interesse - ROI) foram selecionadas manualmente no programa e a densidade foi medida de acordo com os valores da *Integrated Density* de cada fotomicrografia da Microscopia de Excitação por Dois-Fótons.

3.10 Análises Estatísticas

Os dados foram analisados com o software *GraphPad Prism* versão 9.00. Para amostras de três grupos com distribuição normal, foi utilizada ANOVA seguida do pós-teste de Bonferroni. Para amostras de apenas dois grupos, foi aplicado o teste t seguido do teste de Dunn. O valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

4 RESULTADOS

Nesse estudo, foram analisadas 55 amostras de trombos de pacientes com AVCI agudo. Para análises comparativas, os fragmentos dos trombos dos pacientes foram classificados em três grupos com base no número de passagens dos dispositivos de remoção endovascular durante o procedimento TM: 1 passagem (n = 30), 2-3 passagens (n = 17) e mais de 4 passagens (n = 8).

4.1 Análises Macroscópicas e Histopatológicas dos Trombos

Os trombos isquêmicos são heterogêneos em seu formato, tamanho e estrutura (Figura 13). Os coágulos variam de alguns milímetros até mais de 3cm de comprimento e sua estrutura pode ser uma massa única ou subdividida em partes menores.

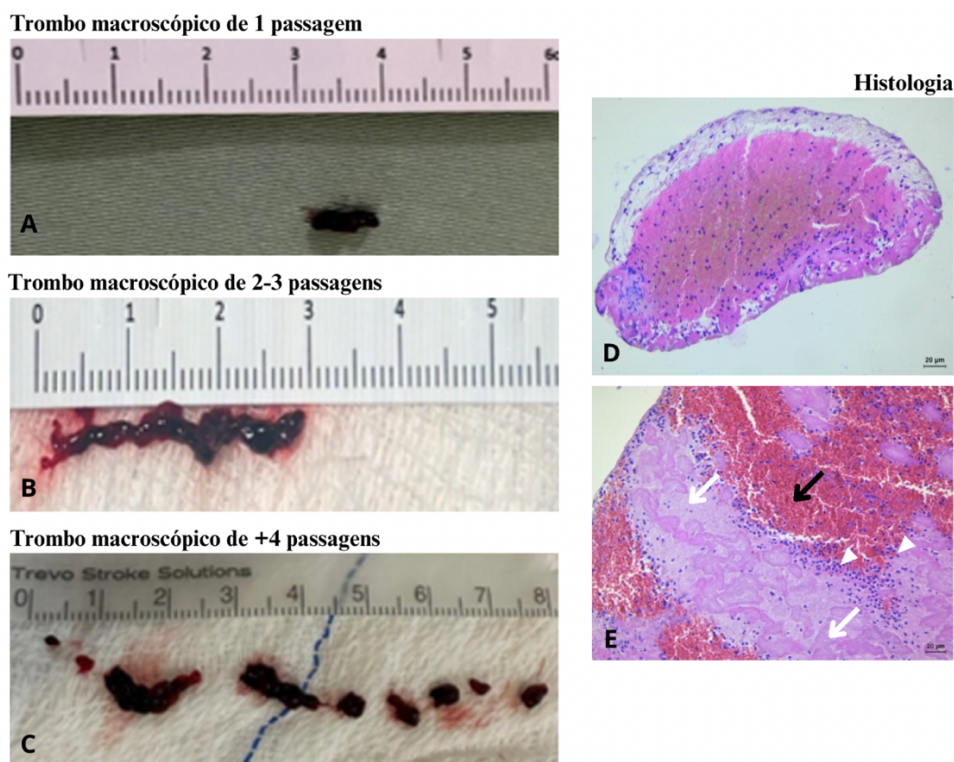


Figura 13. Trombos de pacientes com AVCI obtidos pela técnica de Trombectomia Mecânica. Figuras representativas de análises macroscópicas dos trombos, podendo ser uma massa única [A e B] ou conjunto de pequenos coágulos [C]. Imagens representativas do trombo, constituindo os grupos de 2-3 passagens [D] e de 1 passagem [E], mostrando regiões ricas em eritrócitos (seta preta), fibrina (setas brancas) e leucócitos (cabeças de seta). Coloração: Hematoxilina/Eosina. Barras = 20 μ m.

Os principais constituintes dos trombos de AVC são eritrócitos, fibrina, leucócitos e plaquetas, sendo que a concentração e localização de cada componente são observadas nos diferentes trombos analisados (Figura 14). Os trombos podem ser classificados em vermelhos ou brancos dependendo do tipo celular predominante. Histologicamente, os vermelhos são trombos com maior proporção de eritrócitos (Figura 14 A e B) e os brancos com maior acúmulo de fibrina e leucócitos, e poucos eritrócitos (Figura 14 D e E). A mudança na organização dos trombos pode ocorrer principalmente devido à constante resposta inflamatória do organismo. A inflamação prolongada causada pela isquemia resulta na deposição de plaquetas, redes de fibrina e leucócitos, alterando a composição e organização dos coágulos.

No grupo de 1 passagem, a maioria dos trombos analisados é vermelha (54%), enquanto a proporção de trombos brancos aumenta para 62,5% no grupo de +4 passagens (Figura 14). O grupo de 2-3 passagens tem a mesma proporção de trombos vermelhos e brancos. Uma proporção maior de trombos brancos foi detectada no grupo +4 passagens durante a TM e foi possível observar que o aumento do número de passagens leva à diminuição do número de trombos vermelhos e aumento dos brancos. Histologicamente, observamos diferenças entre o número de passagens e maior deposição de fibrina (trombo branco) em procedimentos de TM mais extensos.

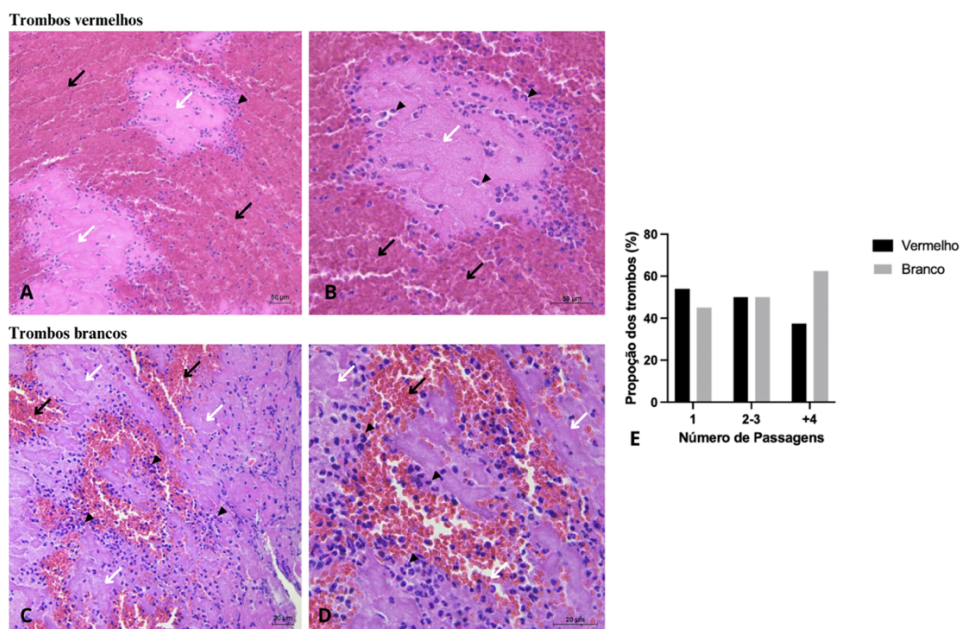


Figura 14. Diferenças histológicas entre trombos vermelhos e brancos. [A e B] Imagem representativa dos trombos vermelhos do grupo de 2-3 passagens, predominantemente compostos por eritrócitos (setas pretas) e poucos leucócitos (cabeças de seta). [C e D] Imagem representativa dos trombos brancos do grupo

de 1 passagem, com maior deposição de fibrina, leucócitos e poucos eritrócitos. [E] Proporção de trombos vermelhos e brancos nos diferentes grupos 1, 2-3 e +4 passagens. Coloração Hematoxilina/Eosina. Barras: A e B = 50 μm ; C e D = 20 μm

Além dos componentes celulares, a matriz extracelular do vaso sanguíneo é abundante em colágeno. Análises histológicas foram realizadas para verificar a possível presença dessa proteína no trombo. Com esse objetivo, as amostras foram submetidas à Microscopia de SHG e, ainda, coradas especificamente pelo Tricrômico de Masson. Os resultados obtidos não mostram positividade para o colágeno nas diferentes técnicas utilizadas.

4.2 Poliedrócitos

Alguns trombos apresentaram eritrócitos com características morfológicas distintas, que podem alterar seu volume e área de superfície. Essas células apresentam uma forma poliédrica devido à compressão das fibras de fibrina pelas plaquetas ativadas, que leva à contração do coágulo e dos eritrócitos. Essa estrutura poliédrica alternativa dos eritrócitos foi observada principalmente em regiões próximas à fibrina dos trombos de AVCI (Figura 15).

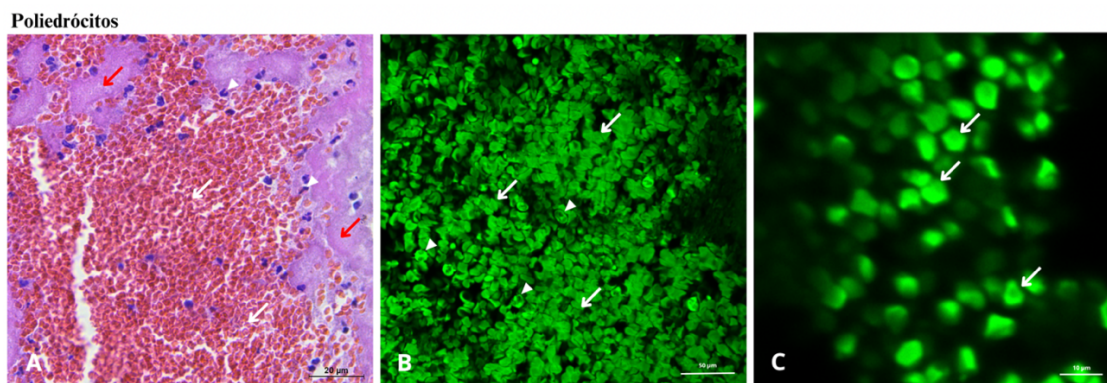


Figura 15. Poliedrócitos pelas Microscopias de Luz e Excitação de Dois-Fótons. Imagem representativa dos poliedrócitos do grupo de 1 passagem em Microscopia de Luz [A] e autofluorescência por Excitação de Dois-Fótons [B-C], mostrando os poliedrócitos (setas brancas) próximos principalmente de regiões de fibrina (setas vermelhas) e leucócitos (cabeças de setas). Coloração Hematoxilina/Eosina. Barras = 20, 50 e 10 μm respectivamente.

4.3 Análises de Plaquetas

As plaquetas são os principais elementos ativados após uma injúria vascular e aglomeram-se no sítio de lesão para controlar a hemostase. Com a ativação da cascata de coagulação, as plaquetas ativadas auxiliam na deposição de fibrina, formando o trombo no vaso sanguíneo. A hemostase é controlada principalmente por plaquetas circulantes no sangue, que são ativadas quando em contato com paredes de vasos danificados.

A quantidade de plaquetas no sangue periférico dos pacientes não mostra diferenças estatísticas entre os grupos de 1, 2-3 e +4 passagens durante a TM, nem entre os trombos vermelhos e brancos (Figura 16). O número de plaquetas no sangue variou pouco entre os grupos e tipos de trombo, permanecendo entre os níveis normais de 150.000 a 400.000 plaquetas por μL de sangue em adultos.

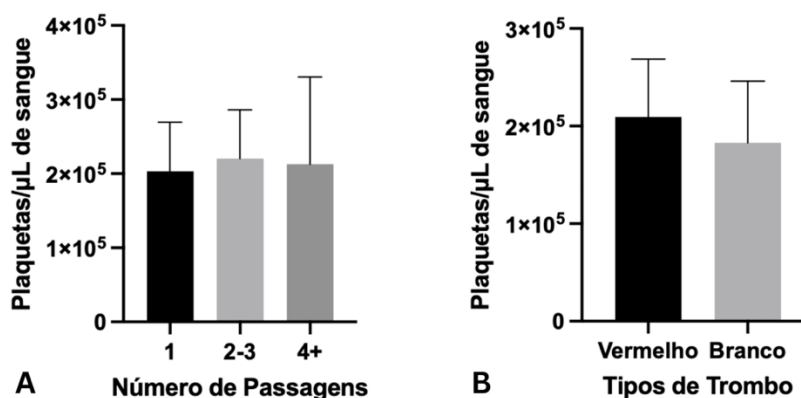


Figura 16. Quantidade de plaquetas no sangue periférico de pacientes com AVCI.

A expressão das plaquetas nos trombos de AVCI foi analisada pela reação de imunohistoquímica e imunofluorescência com o anticorpo anti-CD42b, marcador de plaquetas envolvidas na coagulação e fatores de agregação (Figura 17). Nessas análises foi possível identificar histologicamente nos trombos a relação entre plaquetas, fibrina e leucócitos. As imunomarcações mostram as plaquetas mais concentradas nas regiões ricas em fibrina, com maiores quantidades de leucócitos adjacentes, evidenciando a associação entre esses componentes trombóticos e possível atuação conjunta durante a formação do trombo. A quantificação de plaquetas no coágulo mostrou diferença significativa entre os diferentes grupos (Figura 17 C). O

grupo de 1 passagem apresentou maior porcentagem de plaquetas nos trombos de AVCI, com média de 28,41% de plaquetas em relação à área total do coágulo, enquanto o grupo de +4 passagens apresentou média de 19,48% de plaquetas em todo trombo.

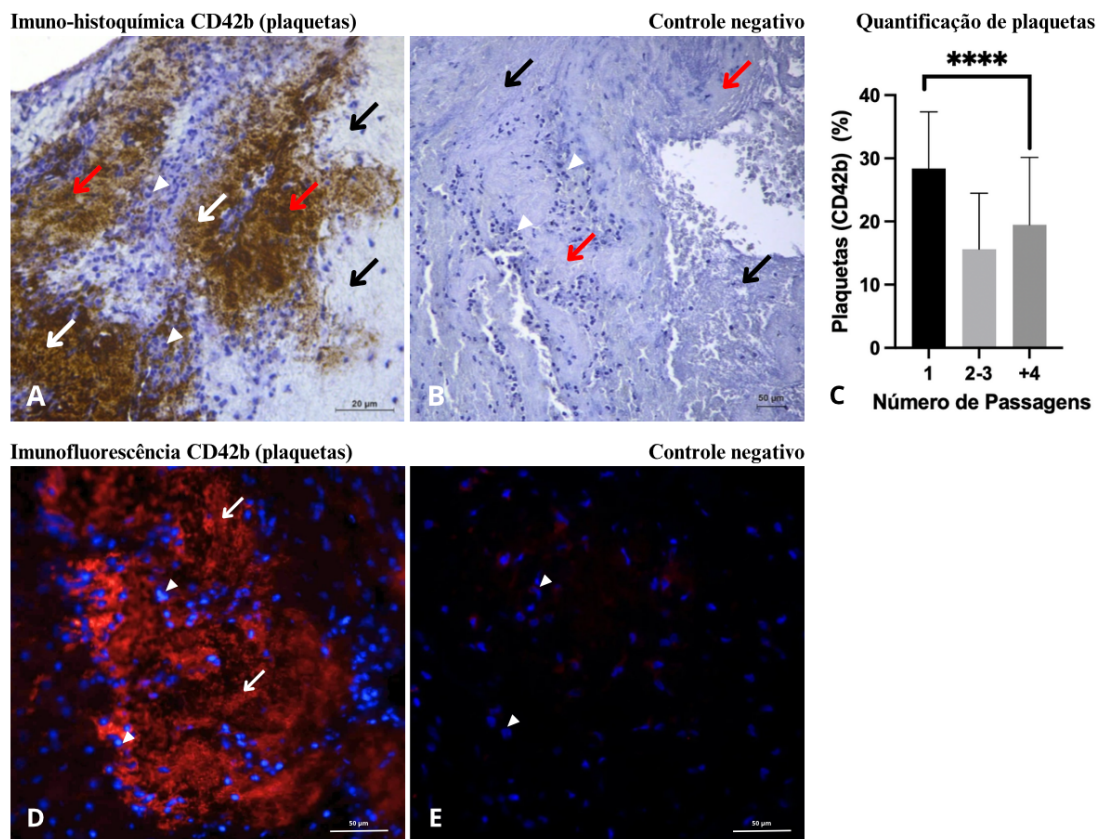


Figura 17. Plaquetas. [A] Imuno-histoquímica - imagem representativa do grupo de 1 passagem mostra plaquetas (seta brancas), com regiões de fibrina (setas vermelhas), eritrócitos (setas pretas) e leucócitos (cabeças de setas brancas). [C] Quantificação da imunomarcagem de CD42b mostra diferença significativa entre os grupos 1 e +4 pelo teste ANOVA, $p < 0,05$. [D] Imunofluorescência - imagem representativa do grupo de 1 passagem mostra a expressão de plaquetas (vermelho) e leucócitos (azul) próximos à periferia das regiões ricas em fibrina. [B e E] Controles negativos das reações de imuno-histoquímica e imunofluorescência, respectivamente. Barras = 20 e 50 μm .

4.4 Leucocitos e Densidade da Fibrina

Os trombos ricos em fibrina têm maior número de leucócitos em relação aos ricos em eritrócitos, um aspecto possivelmente relacionado com a resposta inflamatória, que resulta no recrutamento de células leucocitárias para o local da oclusão do coágulo. Os trombos apresentam regiões ricas em leucócitos, principalmente neutrófilos e eosinófilos, além de eritrócitos e fibrina

(Figura 18 A e B). As células leucocitárias foram quantificadas em trombos vermelhos e brancos (Figura 18 C). Os trombos ricos em eritrócitos apresentaram uma quantidade menor de leucócitos, com média de 54 leucócitos por região, enquanto os ricos em fibrina apresentaram uma média de 123 leucócitos por região. Esses dados evidenciam a diferença significativa no número de células leucocitárias dependendo do tipo e análises histológicas do trombo.

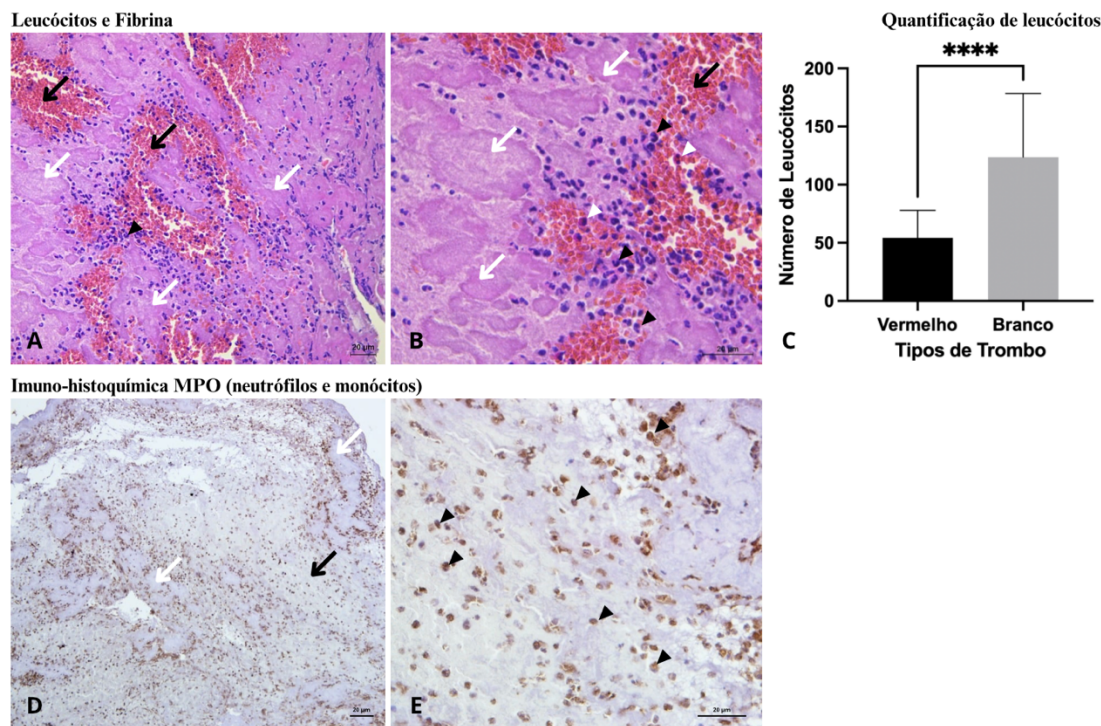


Figura 18. Leucócitos e deposição de fibrina no trombo AVCI. [A] Imagem representativa do grupo de 1 passagem, mostra a heterogeneidade do trombo, regiões ricas em eritrócitos (setas pretas), fibrina (setas brancas) e leucócitos (cabeças de seta pretas). [B] Detalhe do trombo, mostrando regiões ricas em fibrina e leucócitos, principalmente neutrófilos e eosinófilos (cabeças de setas brancas). Coloração: Hematoxilina/Eosina. [C] Quantificação de leucócitos em trombos vermelhos e brancos, diferença significativa entre os grupos pelo teste t, $p < 0,05$. [D] Expressão imuno-histoquímica de MPO – imagem representativa do grupo de +4 passagens mostrando positividade para neutrófilos, representada pela coloração marrom (cabeças de seta), fibrina (setas brancas) e eritrócitos (seta preta). [E] Detalhe dos neutrófilos imunomarcados (cabeças de setas). Barras = 20 μm .

A densidade da fibrina foi mensurada em cada trombo, nos grupos de 1, 2-3 e +4 passagens da TM e nos diferentes tipos de trombos usando a Microscopia por Excitação de Dois-Fótons para melhor resolução e medições mais precisas (Figura 19). Houve aumento significativo da densidade

4.5 Leucócitos e Expressão da Proteína ANXA1

A proteína anti-inflamatória ANXA1 foi intensamente expressa em células leucocitárias dos trombos de AVCI pela reação de imuno-histoquímica (Figura 20), sendo essa expressão observada principalmente no citoplasma dos leucócitos.

Imuno-histoquímica ANXA1

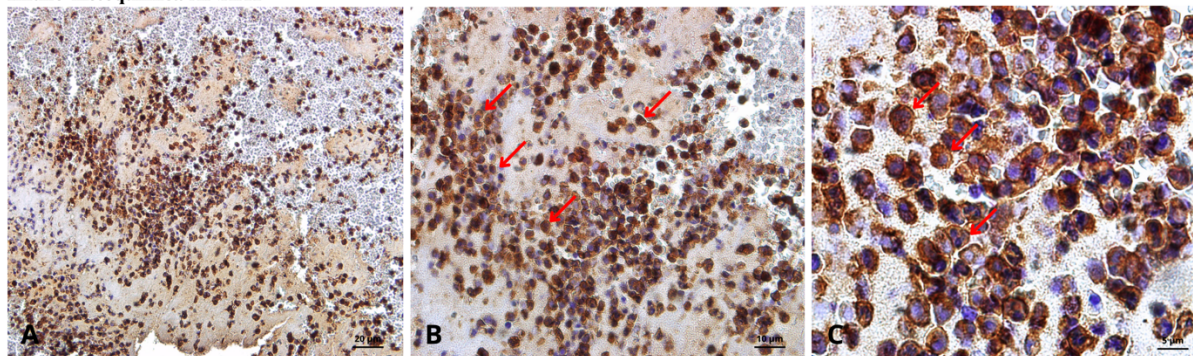


Figura 20. Expressão da proteína anti-inflamatória Anexina A1 (ANXA1) em trombos de AVCI. Imunomarcacão positiva para ANXA1 em leucócitos (setas vermelhas). [B e C] Detalhes da imunomarcacão citoplasmática nas células leucocitárias. Barras = 20, 10 e 5 µm, respectivamente.

5 DISCUSSÃO

A isquemia cerebral é o tipo mais comum de AVC e uma doença extremamente recorrente em pessoas de diversos países e idades. Após interrupção de sangue para determinada região cerebral, imediatamente, forma-se uma zona de isquemia central. Sua extensão de dano celular irreversível depende basicamente do volume da redução de perfusão tecidual e do tempo de instalação, excetuando-se os casos em que o fluxo é restabelecido rapidamente (LI *et al.*, 2021). Nossos resultados mostram que os tipos celulares observados nos trombos isquêmicos podem variar em quantidade e concentração, apresentando principalmente fibrina, plaquetas, eritrócitos e leucócitos. Além disso, apontam que os trombos vermelhos são ricos em eritrócitos e os brancos com acúmulo de fibrina e leucócitos. Esses dados corroboram os estudos de Alkarithi e colaboradores (2021) nas análises dos componentes em trombos de infarto do miocárdio, AVCI e embolismo pulmonar. Dados recentes mostram que a heterogeneidade da composição do trombo depende do local de formação e aspecto patológico (DeLAGRANGE *et al.*, 2023). Os tipos celulares, que compõem os coágulos sanguíneos e suas interações, têm sido estudados para elucidar o mecanismo de formação e atividade do trombo, assim como o possível desenvolvimento de terapias clínicas adequadas.

A distribuição dos componentes celulares nos trombos foi analisada pelo número de passagens do catéter durante o procedimento de TM. A maioria dos pacientes do grupo 1 passagem TM apresentou trombos vermelhos (predominância de eritrócitos), enquanto aproximadamente 60% dos trombos dos pacientes com +4 passagens foi do tipo branco (predominância de fibrina e leucócitos). Os estudos de Mereuta e colaboradores (2021) mostram que coágulos de lesão da parede de vaso são mais abundantes em eritrócitos do que fibrina, com 52,16% de eritrócitos, 29,15% de fibrina, 15,17% de plaquetas e 3,48% de leucócitos.

Nossos dados mostram que a maioria dos trombos, com apenas 1 passagem durante a TM, é do tipo vermelho, possuindo significativamente menos leucócitos e fibrinas menos densas (média de 54 leucócitos por região do trombo e 614.036,20 de densidade de fibrina). Os eritrócitos são componentes determinantes do tipo de trombo e podem influenciar diretamente na facilidade de remoção do coágulo por TM. De acordo com as análises de Gillespie e Doctor (2021), os eritrócitos são os componentes celulares do trombo pouco estudados, provavelmente por terem

sido considerados apenas coadjuvantes da formação do coágulo e pela ausência de conhecimento da sua atividade na hemostase e conversão da protrombina em trombina.

Os estudos realizados com as Microscopias de Luz e por Excitação de Dois-Fótons mostram a deformidade poliedral dos eritrócitos (poliedrócitos). Esta alteração foi descrita pela literatura em caso de doenças circulatórias e pode ocorrer em trombos de pacientes com AVCI. Este formato irregular é capaz de contribuir para a severidade da inflamação, oclusão dos vasos e hemólise. Os poliedrócitos foram previamente estudados em pacientes com doença falciforme (TUTWILER *et al.*, 2021), trombo intracoronário (ZALEWSKI *et al.*, 2019), diabetes tipo 2 (GAJOS *et al.*, 2018) e pela microscopia eletrônica de varredura em pacientes com infarto do miocárdio (CINES *et al.*, 2014). Recentemente, os eritrócitos, em dissecação da aorta, foram descritos com morfologias em diferentes gradações, podendo ser bicôncavo, bicôncavo intermediário, poliedrócito intermediário e poliedrócito como maior grau de compactação de coágulos (SCHEPERS *et al.*, 2023).

Nossas análises mostram a importância de estudos aprofundados sobre a atividade das plaquetas no trombo, podendo ser esses elementos alvos terapêuticos em quadros trombóticos. Pelas técnicas de imuno-histoquímica e imunofluorescência, as plaquetas são abundantes nos trombos de AVCI e estão concentradas nas regiões ricas em fibrinas, junto ao acúmulo de leucócitos. Esses dados corroboram os estudos de Koupenova e colaboradores (2016), que indicam a possibilidade de trombos arteriais serem tratados com terapias voltadas à ativação e agregação plaquetárias.

As plaquetas são aderidas à matriz extracelular exposta no sítio de injúria vascular para proteger o vaso de perda de sangue excessiva (NAVARRO *et al.*, 2021; NEUBAUER; ZIEGER, 2021). Esse processo envolve a atividade coordenada de diferentes receptores de plaqueta, que leva ao rolamento plaquetário adesão firme sobre o vaso danificado (BROOS *et al.*, 2011). A injúria na parede do vaso sanguíneo leva à exposição dos componentes da matriz, principalmente o colágeno. Esta proteína auxilia a adesão das células imunes no local de dano e, portanto, contribui para a formação do trombo. Nossos resultados, por Microscopia por Geração de Segundo-Harmônico, mostram ausência de colágeno no trombo de pacientes com AVCI e, assim como a falta de positividade para esta proteína após colorações histopatológicas específicas. Dessa forma o colágeno pode estar contribuindo apenas no estímulo dos componentes celulares para a formação

do trombo no sítio específico do vaso. Na literatura, Lee e colaboradores (2015) mostram a presença do colágeno em coágulos sanguíneos de tecidos murinos e vasos venosos. Portanto pode ocorrer divergências sobre a presença ou ausência dessa proteína dependendo do organismo e dos métodos e tecidos em estudo.

Nossos estudos envolveram também análises relacionadas com a quantidade e densidade de fibrina, mostrando diferenças significativas entre as diversas passagens TM e tipos de trombo. O grupo de 1 passagem apresentou trombos com fibrinas menos densas, em relação ao de +4 passagens. Trombos mais densos são, conseqüentemente, mais rígidos portanto mais difíceis de serem retirados por técnicas de recuperação endovascular. Duffy e colaboradores (2019) mostram também alterações histológicas em trombos de diferentes passagens, nos quais fragmentos de trombo de 1 e 2 passagens apresentam menos fibrina que os recuperados em 3 a 6 passagens. A compactação das redes de fibrina em passagens de TM mais extensas provavelmente deixa o trombo mais resistência à lise, podendo estar relacionada com maior déficit neurológico e severidade do AVC. Ząbczyk e Undas (2017) afirmam que a fibrina está diretamente envolvida na patogênese e prognose de eventos trombóticos. Além disso, pacientes que precisam de mais de 2 passagens durante a TM apresentam, no geral, desfechos clínicos piores, maiores taxas de mortalidade e menores taxas de recanalização (LUBY *et al.*, 2021).

A presença de leucócitos é quantitativamente maior em trombos ricos em fibrina, confirmando a heterogeneidade e diferença de composição que trombos de AVCI podem apresentar. A quantidade de células leucocitárias foi significativamente diferente em coágulos vermelhos e brancos, possivelmente devido à associação com a fibrina e plaquetas no processo de isquemia. Durante a formação do trombo, os leucócitos recrutados para o sítio de injúria vascular auxiliam na organização de elementos como fibrina e ativação de plaquetas (BECKER *et al.*, 2018).

A isquemia é um processo multicelular com várias etapas que estimula a inflamação, ativa leucócitos, principalmente neutrófilos, e estimula a agregação de plaquetas e fibrina nos coágulos sanguíneos. Os dados corroboram a hipótese de que terapias anti-inflamatórias podem limitar a trombose e terapias antitrombóticas podem reduzir a inflamação vascular (IFFAH; GAVINS, 2021). Um desses alvos pode ser o mediador endógeno anti-inflamatório e pró-resolução a proteína anti-inflamatória Anexina A1 (ANXA1). Os leucócitos observados nos coágulos de AVCI

expressam ANXA1, indicando a presença citoplasmática desta proteína nestes tipos celulares, mesmo em trombos fora da corrente sanguínea. A expressão da ANXA1 pode regular quimiocinas, receptores de quimiocinas e infiltração e migração endotelial de células imunes, como leucócitos (ZHANG *et al.*, 2023). A presença de ANXA1 em leucócitos de AVCI, representada pela expressão positiva de imuno-histoquímica, sugere que esta proteína anti-inflamatória pode ser utilizada como possível terapia anti-trombótica. Estudos anteriores de Zhou e colaboradores (2023) e do nosso laboratório (ZHARKOVA *et al.*, 2023; GIROL *et al.*, 2021) demonstram que a regulação da função da ANXA1 pode apresentar efeitos protetores em células de lesão isquêmica, evidenciando seu potencial clínico como alvo terapêutico em isquemias.

A maioria dos dados sobre a ação da ANXA1 é feita em modelos animais, sendo interessante o estudo aprofundado da expressão dessa proteína em tecidos humanos, como é realizado no presente trabalho. A atividade da ANXA1 ainda não é totalmente elucidada em diversas doenças, como artrite reumatóide, fibrose pulmonar idiopática e câncer. Assim, sua expressão pode ser aumentada ou diminuída em diferentes quadros inflamatórios (KELLY *et al.*, 2022). Investigações anteriores em lesões avançadas ateroscleróticas de camundongos mostram a estabilização dessas feridas após administração do peptídeo N-terminal Ac2-26 da ANXA1, sugerindo novas formas terapêuticas baseadas na capacidade de resolução inflamatória desta proteína (FREDMAN *et al.*, 2015).

Em conjunto, nossas análises sugerem que a composição histopatológica está diretamente associada com a quantidade de passagens do catéter durante a TM, visto que o acúmulo de componentes celulares influencia a dificuldade de remoção do trombo do vaso sanguíneo. Desta forma, é importante o desenvolvimento de mecanismos mais eficientes que removam o trombo em menos passagens para recanalizações/desfechos clínicos mais eficientes. A expressão da proteína anti-inflamatória ANXA1 em leucócitos evidencia sua atividade como tratamento promissor em quadros inflamatórios, como o AVCI.

6 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos permitem concluir:

- Os trombos isquêmicos de pacientes com AVCI, obtidos pelo procedimento de Trombectomia Mecânica (TM), apresentam heterogeneidade significativa na composição, estrutura dos coágulos e diferenciam no formato, tamanho e tipo celular;
- Os trombos são classificados em vermelhos (ricos em eritrócitos) e brancos (ricos em fibrina e leucócitos).
- As passagens do catéter de 1, 2-3 e +4 durante o procedimento de TM apresentam diferenças na composição histológica do trombo, com maior proporção de trombos brancos, densos e ricos em leucócitos em +4 passagens;
- Agregação de plaquetas e leucócitos são observadas nos trombos de regiões ricas em fibrina;
- O colágeno é ausente nos trombos após TM, indicando que esse componente pode estar restrito à matriz extracelular do vaso sanguíneo;
- A expressão citoplasmática da proteína anti-inflamatória Anexina A1 (ANXA1) é observada em leucócitos dos trombos estudados.

Associados, nossos resultados ressaltam a complexidade dos trombos de pacientes com AVCI, evidenciando que a composição celular e resposta inflamatória modulam a eficácia de recuperações endovasculares. A análise da composição do trombo em relação às taxas de recanalização da TM, tempo de recanalização e eficácia dos diferentes dispositivos endovasculares pode, no futuro, contribuir no desenvolvimento de estratégias terapêuticas e diagnósticas mais eficientes. Ainda, expressão da proteína anti-inflamatória ANXA1 em leucócitos pode representar um potencial promissor para o desenvolvimento de novas abordagens clínicas em contextos isquêmicos.

REFERÊNCIAS

AGHIGH, Arash *et al.* Second harmonic generation microscopy: a powerful tool for bio-imaging. **Biophysical Reviews**, v. 15, n. 1, p. 43-70, 19 jan. 2023. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s12551-022-01041-6>.

AJOOLABADY, Amir *et al.* Targeting autophagy in ischemic stroke: from molecular mechanisms to clinical therapeutics. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 225, p. 107848, set. 2021. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pharmthera.2021.107848>.

ALKARITHI, Ghadir *et al.* Thrombus Structural Composition in Cardiovascular Disease. **Arteriosclerosis, Thrombosis, And Vascular Biology**, v. 41, n. 9, p. 2370-2383, set. 2021. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health). <http://dx.doi.org/10.1161/atvbaha.120.315754>.

ANSARI, Junaid *et al.* Therapeutic Potential of Annexin A1 in Ischemia Reperfusion Injury. **International Journal Of Molecular Sciences**, v. 19, n. 4, p. 1211, 16 abr. 2018. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/ijms19041211>.

ANSARI, Junaid; GAVINS, Felicity N. E.. Neutrophils and Platelets: immune soldiers fighting together in stroke pathophysiology. **Biomedicines**, v. 9, n. 12, p. 1945, 19 dez. 2021. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/biomedicines9121945>.

ARIËNS, Robert A. S.. Innate capability of clot contraction. **Blood**, v. 143, n. 6, p. 481-482, 8 fev. 2024. American Society of Hematology. <http://dx.doi.org/10.1182/blood.2023023200>.

AROOR, Sushanth *et al.* BE-FAST (Balance, Eyes, Face, Arm, Speech, Time). **Stroke**, v. 48, n. 2, p. 479-481, fev. 2017. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health). <http://dx.doi.org/10.1161/strokeaha.116.015169>.

BECKER, Richard C. *et al.* Translational Implications of Platelets as Vascular First Responders. **Circulation Research**, v. 122, n. 3, p. 506-522, 2 fev. 2018. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health). <http://dx.doi.org/10.1161/circresaha.117.310939>.

BENDER, Markus; PALANKAR, Raghavendra. Platelet Shape Changes during Thrombus Formation: role of actin-based protrusions. **Hämostaseologie**, v. 41, n. 01, p. 014-021, fev. 2021. Georg Thieme Verlag KG. <http://dx.doi.org/10.1055/a-1325-0993>.

BETTIOL, Alessandra *et al.* Erythrocyte oxidative stress and thrombosis. **Expert Reviews In Molecular Medicine**, v. 24, p. 1-10, ago. 2022. Cambridge University Press (CUP). <http://dx.doi.org/10.1017/erm.2022.25>.

BOODT, Nikki *et al.* Mechanical Characterization of Thrombi Retrieved With Endovascular Thrombectomy in Patients With Acute Ischemic Stroke. **Stroke**, v. 52, n. 8, p. 2510-2517, ago. 2021. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health). <http://dx.doi.org/10.1161/strokeaha.120.033527>.

BROOS, Katleen *et al.* Platelets at work in primary hemostasis. **Blood Reviews**, v. 25, n. 4, p. 155-167, jul. 2011. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.blre.2011.03.002>.

CHANDRASHEKAR, Anirudh *et al.* Mechanical and Biochemical Role of Fibrin Within a Venous Thrombus. **European Journal Of Vascular And Endovascular Surgery**, v. 55, n. 3, p. 417-424, mar. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejvs.2017.12.002>.

CHAPIN, John C.; HAJJAR, Katherine A.. Fibrinolysis and the control of blood coagulation. **Blood Reviews**, v. 29, n. 1, p. 17-24, jan. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.blre.2014.09.003>.

CHEN, Xi *et al.* Leukocytes in Cerebral Thrombus Respond to Large-Vessel Occlusion in a Time-Dependent Manner and the Association of NETs With Collateral Flow. **Frontiers In Immunology**, v. 13, 17 fev. 2022. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fimmu.2022.834562>.

CINES, Douglas B. *et al.* Clot contraction: compression of erythrocytes into tightly packed polyhedra and redistribution of platelets and fibrin. **Blood**, v. 123, n. 10, p. 1596-1603, 6 mar. 2014. American Society of Hematology. <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2013-08-523860>.

COLLET, Jean-Philippe *et al.* Dynamic Changes of Fibrin Architecture during Fibrin Formation and Intrinsic Fibrinolysis of Fibrin-rich Clots. **Journal Of Biological Chemistry**, v. 278, n. 24, p. 21331-21335, jun. 2003. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.m212734200>.

DeLAGRANGE, Daniela *et al.* Spatial heterogeneity of occlusive thrombus in acute ischemic stroke: a systematic review. **Journal Of Neuroradiology**, v. 50, n. 3, p. 352-360, maio 2023. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.neurad.2023.01.004>.

DIASPRO, Alberto *et al.* Two-photon fluorescence excitation and related techniques in biological microscopy. **Quarterly Reviews Of Biophysics**, v. 38, n. 2, p. 97-166, maio 2005. Cambridge University Press (CUP). <http://dx.doi.org/10.1017/s0033583505004129>.

DUFFY, Sharon *et al.* Per-Pass Analysis of Thrombus Composition in Patients With Acute Ischemic Stroke Undergoing Mechanical Thrombectomy. **Stroke**, v. 50, n. 5, p. 1156-1163, maio 2019. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health). <http://dx.doi.org/10.1161/strokeaha.118.023419>.

ELLIOTT, Amicia D. *et al.* Confocal Microscopy: principles and modern practices. **Current Protocols In Cytometry**, v. 92, n. 1, p. 1-1, 26 dez. 2019. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/cpcy.68>.

FEIGIN, Valery L *et al.* World Stroke Organization (WSO): global stroke fact sheet 2022. **International Journal Of Stroke**, v. 17, n. 1, p. 18-29, jan. 2022. SAGE Publications. <http://dx.doi.org/10.1177/17474930211065917>.

FLOWER, R.J.. Lipocortin and the mechanism of action of the glucocorticoids. **British Journal Of Pharmacology**, v. 94, n. 4, p. 987-1015, ago. 1988. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1476-5381.1988.tb11614.x>.

FREDMAN, Gabrielle *et al.* Targeted nanoparticles containing the proresolving peptide Ac2-26 protect against advanced atherosclerosis in hypercholesterolemic mice. **Science Translational Medicine**, v. 7, n. 275, 18 fev. 2015. American Association for the Advancement of Science (AAAS). <http://dx.doi.org/10.1126/scitranslmed.aaa1065>.

GAJOS, Grzegorz *et al.* Polyhedrocytes in blood clots of type 2 diabetic patients with high cardiovascular risk: association with glycemia, oxidative stress and platelet activation. **Cardiovascular Diabetology**, v. 17, n. 1, p. 2, 22 nov. 2018. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/s12933-018-0789-6>.

GAVINS, Felicity N. E. *et al.* Annexin A1 and the regulation of innate and adaptive immunity. **Frontiers In Immunology**, v. 3, 2012. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fimmu.2012.00354>.

GILL, Dipender *et al.* Genetically Determined FXI (Factor XI) Levels and Risk of Stroke. **Stroke**, v. 49, n. 11, p. 2761-2763, nov. 2018. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health). <http://dx.doi.org/10.1161/strokeaha.118.022792>.

GILLESPIE, Andrea H.; DOCTOR, Allan. Red Blood Cell Contribution to Hemostasis. **Frontiers In Pediatrics**, v. 9, 1 abr. 2021. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fped.2021.629824>.

GIROL, Ana Paula *et al.* Annexin A1 Mimetic Peptide and Piperlongumine: anti-inflammatory profiles in endotoxin-induced uveitis. **Cells**, v. 10, n. 11, p. 3170, 15 nov. 2021. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/cells10113170>.

GOMEZ, Camilo R.. Editorial: time is brain!. **Journal Of Stroke And Cerebrovascular Diseases**, v. 3, n. 1, p. 1-2, jan. 1993. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s1052-3057\(10\)80125-9](http://dx.doi.org/10.1016/s1052-3057(10)80125-9).

GOMEZ, Camilo R.. Time Is Brain: the stroke theory of relativity. **Journal Of Stroke And Cerebrovascular Diseases**, v. 27, n. 8, p. 2214-2227, ago. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2018.04.001>.

GOTTLOB, R *et al.* Studies on Thrombolysis with Streptokinase. **Thrombosis And Haemostasis**, v. 25, n. 02, p. 354-378, 1971. Georg Thieme Verlag KG. <http://dx.doi.org/10.1055/s-0038-1654310>.

GRECO, Antonio *et al.* Pharmacology and Clinical Development of Factor XI Inhibitors. **Circulation**, v. 147, n. 11, p. 897-913, 14 mar. 2023. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health). <http://dx.doi.org/10.1161/circulationaha.122.062353>.

GUZIK, Amy; BUSHNELL, Cheryl. Stroke Epidemiology and Risk Factor Management. **Continuum: Lifelong Learning in Neurology**, v. 23, n. 1, p. 15-39, fev. 2017. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health). <http://dx.doi.org/10.1212/con.0000000000000416>.

HAN, Zhongyu *et al.* The role of monocytes in thrombotic diseases: a review. **Frontiers In Cardiovascular Medicine**, v. 10, 2 jun. 2023. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fcvm.2023.1113827>.

HELMCHEN, Fritjof; DENK, Winfried. Deep tissue two-photon microscopy. **Nature Methods**, v. 2, n. 12, p. 932-940, 18 nov. 2005. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nmeth818>.

HERRE, Melanie *et al.* Neutrophil extracellular traps in the pathology of cancer and other inflammatory diseases. **Physiological Reviews**, v. 103, n. 1, p. 277-312, 1 jan. 2023. American Physiological Society. <http://dx.doi.org/10.1152/physrev.00062.2021>.

HOLLIST, Mary *et al.* Acute Stroke Management: overview and recent updates. **Aging And Disease**, v. 12, n. 4, p. 1000, 2021. Aging and Disease. <http://dx.doi.org/10.14336/ad.2021.0311>.

IFFAH, Raayma; GAVINS, Felicity N. E.. Thromboinflammation in coronavirus disease 2019: the clot thickens. **British Journal Of Pharmacology**, v. 179, n. 10, p. 2100-2107, 19 jul. 2021. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/bph.15594>.

JADHAV, Ashutosh P. *et al.* Indications for Mechanical Thrombectomy for Acute Ischemic Stroke. **Neurology**, v. 97, n. 202, 16 nov. 2021. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health). <http://dx.doi.org/10.1212/wnl.00000000000012801>.

JILANI TN, SIDDIQUI AH. Tissue Plasminogen Activator. [Updated 2023 Feb 20]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): **StatPearls Publishing**; Jan. 2023. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK507917/>

JIN, Rong *et al.* Role of Inflammation and Its Mediators in Acute Ischemic Stroke. **Journal Of Cardiovascular Translational Research**, v. 6, n. 5, p. 834-851, 5 set. 2013. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s12265-013-9508-6>.

JOLUGBO, Precious; ARIËNS, Robert A.s.. Thrombus Composition and Efficacy of Thrombolysis and Thrombectomy in Acute Ischemic Stroke. **Stroke**, v. 52, n. 3, p. 1131-1142, mar. 2021. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health). <http://dx.doi.org/10.1161/strokeaha.120.032810>.

JORDAN, James *et al.* The role of neutrophils in myocardial ischemia–reperfusion injury. **Cardiovascular Research**, v. 43, n. 4, p. 860-878, set. 1999. Oxford University Press (OUP). [http://dx.doi.org/10.1016/s0008-6363\(99\)00187-x](http://dx.doi.org/10.1016/s0008-6363(99)00187-x).

JOUNDI, Raed A. *et al.* Thrombus Composition, Imaging, and Outcome Prediction in Acute Ischemic Stroke. **Neurology**, v. 97, n. 202, p. 0, 16 nov. 2021. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health). <http://dx.doi.org/10.1212/wnl.00000000000012796>.

KANJI, Rahim *et al.* Fibrinolysis in Platelet Thrombi. **International Journal Of Molecular Sciences**, v. 22, n. 10, p. 5135, 12 maio 2021. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/ijms22105135>.

KELLY, Lauren *et al.* Annexin-A1: the culprit or the solution?. **Immunology**, v. 166, n. 1, p. 2-16, mar. 2022. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/imm.13455>.

KOUPENOVA, Milka *et al.* Thrombosis and platelets: an update. **European Heart Journal**, 30 dez. 2016. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/eurheartj/ehw550>.

KRÜGER-GENGE, Anne *et al.* Vascular Endothelial Cell Biology: an update. **International Journal Of Molecular Sciences**, v. 20, n. 18, p. 4411, 7 set. 2019. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/ijms20184411>.

LEE, Y.-U. *et al.* Histological and biomechanical changes in a mouse model of venous thrombus remodeling. **Biorheology**, v. 52, n. 3, p. 235-245, 29 set. 2015. IOS Press. <http://dx.doi.org/10.3233/bir-15058>.

LEONG, Lilley *et al.* Clot stability as a determinant of effective factor VIII replacement in hemophilia A. **Research And Practice In Thrombosis And Haemostasis**, v. 1, n. 2, p. 231-241, out. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1002/rth2.12034>.

LI, Wei *et al.* Nonuniform Internal Structure of Fibrin Fibers: protein density and bond density strongly decrease with increasing diameter. **Biomed Research International**, v. 2017, p. 1-13, 2017. Hindawi Limited. <http://dx.doi.org/10.1155/2017/6385628>.

LI, Xinye *et al.* Targeting Ferroptosis: pathological mechanism and treatment of ischemia/reperfusion injury. **Oxidative Medicine And Cellular Longevity**, v. 2021, n. 1, jan. 2021. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1155/2021/1587922>.

LIM, Lina H. K.; PERVAIZ, Shazib. Annexin 1: the new face of an old molecule. **The FASEB Journal**, v. 21, n. 4, p. 968-975, 10 jan. 2007. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1096/fj.06-7464rev>.

LITVINOV, Rustem I.; WEISEL, John W.. Blood clot contraction: mechanisms, pathophysiology, and disease. **Research And Practice In Thrombosis And Haemostasis**, v. 7, n. 1, p. 100023, jan. 2023. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.rpth.2022.100023>.

LIZARBE, María *et al.* Annexin-Phospholipid Interactions. Functional Implications. **International Journal Of Molecular Sciences**, v. 14, n. 2, p. 2652-2683, 28 jan. 2013. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/ijms14022652>.

LU, Meng-Jiao *et al.* Monocyte/macrophage-mediated venous thrombus resolution. **Frontiers In Immunology**, v. 15, 19 jul. 2024. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fimmu.2024.1429523>.

LUBY, Marie *et al.* Association of Multiple Passes during Mechanical Thrombectomy with Incomplete Reperfusion and Lesion Growth. **Cerebrovascular Diseases**, v. 51, n. 3, p. 394-402, 13 dez. 2021. S. Karger AG. <http://dx.doi.org/10.1159/000519796>.

MAIDA, Carlo Domenico *et al.* Neuroinflammatory Mechanisms in Ischemic Stroke: focus on cardioembolic stroke, background, and therapeutic approaches. **International Journal Of Molecular Sciences**, v. 21, n. 18, p. 6454, 4 set. 2020. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/ijms21186454>.

MANDEL, Jonathan *et al.* Beyond Hemostasis: platelet innate immune interactions and thromboinflammation. **International Journal Of Molecular Sciences**, v. 23, n. 7, p. 3868, 31 mar. 2022. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/ijms23073868>.

MANON-JENSEN, T. *et al.* Collagen-mediated hemostasis. **Journal Of Thrombosis And Haemostasis**, v. 14, n. 3, p. 438-448, mar. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1111/jth.13249>.

MARTIN, Seth S. *et al.* 2024 Heart Disease and Stroke Statistics: a report of us and global data from the american heart association. **Circulation**, 24 jan. 2024. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health). <http://dx.doi.org/10.1161/cir.0000000000001209>.

MEIJDEN, Paola E. J. van Der; HEEMSKERK, Johan W. M.. Platelet biology and functions: new concepts and clinical perspectives. **Nature Reviews Cardiology**, v. 16, n. 3, p. 166-179, 14 nov. 2018. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41569-018-0110-0>.

MEREUTA, Oana Madalina *et al.* Histological evaluation of acute ischemic stroke thrombi may indicate the occurrence of vessel wall injury during mechanical thrombectomy. **Journal Of Neurointerventional Surgery**, v. 14, n. 4, p. 356-361, 11 maio 2021. BMJ. <http://dx.doi.org/10.1136/neurintsurg-2021-017310>.

MUKHOPADHYAY, Subhradip *et al.* Fibrinolysis and Inflammation in Venous Thrombus Resolution. **Frontiers In Immunology**, v. 10, 14 jun. 2019. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fimmu.2019.01348>.

MUNN, Terry Z.; MUES, Gabriele I.. Human lipocortin similar to ras gene products. **Nature**, v. 322, n. 6077, p. 314-315, jul. 1986. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/322314a0>.

MUNOZ, Alfredo *et al.* A review of mechanical thrombectomy techniques for acute ischemic stroke. **Interventional Neuroradiology**, v. 29, n. 4, p. 450-458, 3 mar. 2022. SAGE Publications. <http://dx.doi.org/10.1177/15910199221084481>.

NATAL, Rodrigo de Andrade. Aplicação da microscopia por geração de segundo-harmônico na avaliação do câncer de mama. **Repositório Unicamp**, 2019. Universidade Estadual de Campinas. <http://dx.doi.org/10.47749/t/unicamp.2019.1126171>.

NAVARRO, Stefano *et al.* Temporal Roles of Platelet and Coagulation Pathways in Collagen- and Tissue Factor-Induced Thrombus Formation. **International Journal Of Molecular Sciences**, v. 23, n. 1, p. 358, 29 dez. 2021. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/ijms23010358>.

NEUBAUER, Katharina; ZIEGER, Barbara. Endothelial cells and coagulation. **Cell And Tissue Research**, v. 387, n. 3, p. 391-398, 20 maio 2021. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s00441-021-03471-2>.

NIESWANDT, B. *et al.* Platelet adhesion and activation mechanisms in arterial thrombosis and ischaemic stroke. **Journal Of Thrombosis And Haemostasis**, v. 9, p. 92-104, jul. 2011. Elsevier BV. <https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2011.04361.x>

OLIANI, Sonia M.; DAMAZO, Amilcar S.; PERRETTI, Mauro. Annexin 1 localisation in tissue eosinophils as detected by electron microscopy. **Mediators Of Inflammation**, v. 11, n. 5, p. 287-292, jan. 2002. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1080/09629350210000015683>.

PAUL, Surojit *et al.* Emerging neuroprotective strategies for the treatment of ischemic stroke: an overview of clinical and preclinical studies. **Experimental Neurology**, v. 335, p. 113518, jan. 2021. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.expneurol.2020.113518>.

PAWLUK, Hanna *et al.* The Role of Selected Pro-Inflammatory Cytokines in Pathogenesis of Ischemic Stroke. **Clinical Interventions In Aging**, v. 15, p. 469-484, mar. 2020. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.2147/cia.s233909>.

RADA, Balázs. Neutrophil Extracellular Traps. **Methods In Molecular Biology**, p. 517-528, 2019. Springer New York. http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4939-9424-3_31.

ROTH, Shmuel; FREUND, Isaac. Optical second-harmonic scattering in rat-tail tendon. **Biopolymers**, v. 20, n. 6, p. 1271-1290, jun. 1981. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/bip.1981.360200613>.

SAINI, Vasu *et al.* Global Epidemiology of Stroke and Access to Acute Ischemic Stroke Interventions. **Neurology**, v. 97, n. 202, 16 nov. 2021. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health). <http://dx.doi.org/10.1212/wnl.00000000000012781>.

SAWMYNADEN, Prescilla; PERRETTI, Mauro. Glucocorticoid upregulation of the annexin-A1 receptor in leukocytes. **Biochemical And Biophysical Research Communications**, v. 349, n. 4, p. 1351-1355, nov. 2006. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2006.08.179>.

SCHEPERS, Luke E. *et al.* Aortic dissection detection and thrombus structure quantification using volumetric ultrasound, histology, and scanning electron microscopy. **Jvs-Vascular Science**, v. 4, p. 100105, 2023. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jvssci.2023.100105>.

SHETH, Sunil A.. Mechanical Thrombectomy for Acute Ischemic Stroke. **Continuum: Lifelong Learning in Neurology**, v. 29, n. 2, p. 443-461, abr. 2023. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health). <http://dx.doi.org/10.1212/con.0000000000001243>.

STAESSENS, Senna; MEYER, Simon F. de. Thrombus heterogeneity in ischemic stroke. **Platelets**, v. 32, n. 3, p. 331-339, 20 abr. 2020. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/09537104.2020.1748586>.

SWYSTUN, Laura L.; LIAW, Patricia C.. The role of leukocytes in thrombosis. **Blood**, v. 128, n. 6, p. 753-762, 11 ago. 2016. American Society of Hematology. <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2016-05-718114>.

TUTWILER, Valerie *et al.* Pathologically stiff erythrocytes impede contraction of blood clots. **Journal Of Thrombosis And Haemostasis**, v. 19, n. 8, p. 1990-2001, ago. 2021. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1111/jth.15407>.

TUTWILER, Valerie *et al.* Shape changes of erythrocytes during blood clot contraction and the structure of polyhedrocytes. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, 17 dez. 2018. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-018-35849-8>.

VRIES, Paul S. de *et al.* A genome-wide association study identifies new loci for factor VII and implicates factor VII in ischemic stroke etiology. **Blood**, v. 133, n. 9, p. 967-977, 28 fev. 2019. American Society of Hematology. <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2018-05-849240>.

WANG, Yiming *et al.* Extracellular matrix proteins in the regulation of thrombus formation. **Current Opinion In Hematology**, v. 23, n. 3, p. 280-287, maio 2016. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health). <http://dx.doi.org/10.1097/moh.0000000000000237>.

WEISEL, J.W.; LITVINOV, R.I.. Red blood cells: the forgotten player in hemostasis and thrombosis. **Journal Of Thrombosis And Haemostasis**, v. 17, n. 2, p. 271-282, fev. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1111/jth.14360>.

WEISEL, John W.; LITVINOV, Rustem I.. Fibrin Formation, Structure and Properties. **Subcellular Biochemistry**, p. 405-456, 2017. Springer International Publishing. http://dx.doi.org/10.1007/978-3-319-49674-0_13.

WINTER, William e *et al.* Coagulation Testing in the Core Laboratory. **Laboratory Medicine**, v. 48, n. 4, p. 295-313, nov. 2017. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/labmed/lmx050>.

WU, Meng-Yu *et al.* Current Mechanistic Concepts in Ischemia and Reperfusion Injury. **Cellular Physiology And Biochemistry**, v. 46, n. 4, p. 1650-1667, 2018. S. Karger AG. <http://dx.doi.org/10.1159/000489241>.

XU, Xin *et al.* Annexin A1 protects against cerebral ischemia–reperfusion injury by modulating microglia/macrophage polarization via FPR2/ALX-dependent AMPK–mTOR pathway. **Journal Of Neuroinflammation**, v. 18, n. 1, 22 maio 2021. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/s12974-021-02174-3>.

ZaBCZYK, Michał; UNDAS, Anetta. Plasma fibrin clot structure and thromboembolism: clinical implications. **Polish Archives Of Internal Medicine**, v. 127, n. 12, p. 873-881, 11 dez. 2017. Medycyna Praktyczna. <http://dx.doi.org/10.20452/pamw.4165>.

ZAŁEWSKI, Jarosław *et al.* Polyhedral erythrocytes in intracoronary thrombus and their association with reperfusion in myocardial infarction. **Clinical Research In Cardiology**, v. 108, n. 8, p. 950-962, 1 fev. 2019. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s00392-019-01425-x>.

ZHANG, Jian *et al.* ANXA1 is identified as a key gene associated with high risk and T cell infiltration in primary sclerosing cholangitis. **Human Genomics**, v. 17, n. 1, 21 set. 2023. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/s40246-023-00534-z>.

ZHARKOVA, Olga *et al.* Deletion of Annexin A1 in Mice Upregulates the Expression of Its Receptor, Fpr2/3, and Reactivity to the AnxA1 Mimetic Peptide in Platelets. **International Journal Of Molecular Sciences**, v. 24, n. 4, p. 3424, 8 fev. 2023. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/ijms24043424>.

ZHOU, Huijuan *et al.* Tat-NTS peptide protects neurons against cerebral ischemia-reperfusion injury via ANXA1 SUMOylation in microglia. **Theranostics**, v. 13, n. 15, p. 5561-5583, 2023. Ivyspring International Publisher. <http://dx.doi.org/10.7150/thno.85390>.

ZHUANG, Youwen *et al.* Molecular recognition of formylpeptides and diverse agonists by the formylpeptide receptors FPR1 and FPR2. **Nature Communications**, v. 13, n. 1, 25 fev. 2022. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41467-022-28586-0>.