



**RENATA PROENÇA FERREIRA**

**INTERAÇÕES DE PLAQUETAS DE  
PACIENTES COM ANEMIA FALCIFORME E  
CÉLULAS ENDOTELIAIS DE VEIA  
UMBILICAL HUMANA (HUVEC)**

**Campinas**

**2013**





**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS**

**RENATA PROENÇA FERREIRA**

**INTERAÇÕES DE PLAQUETAS DE PACIENTES COM ANEMIA FALCIFORME  
E CÉLULAS ENDOTELIAIS DE VEIA UMBILICAL HUMANA (HUVEC)**

***Orientadora: Profa. Dra Nicola Amanda Conran Zorzetto***

***Coorientador: Prof. Dr. Fernando Ferreira Costa***

*Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em  
Clínica Médica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade  
Estadual de Campinas para obtenção do título de Doutora em  
Clínica Médica, área de concentração em Ciências Básicas.*

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA  
DISSERTAÇÃO/ TESE DEFENDIDA PELA ALUNA  
**RENATA PROENÇA FERREIRA** E ORIENTADA PELA  
**PROFA. DRA. NICOLA AMANDA CONRAN  
ZORZETTO.**

Assinatura da Orientadora

\_\_\_\_\_

**CAMPINAS**

**2013**

Ficha catalográfica  
Universidade Estadual de Campinas  
Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas  
Maristella Soares dos Santos - CRB 8/8402

P942i Proença-Ferreira, Renata, 1980-  
Interações de plaquetas de pacientes com anemia falciforme e células endoteliais de veia umbilical humana (HUVEC) / Renata Proença Ferreira. – Campinas, SP : [s.n.], 2013.

Orientador: Nicola Amanda Conran Zorzetto.

Coorientador: Fernando Ferreira Costa.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Anemia falciforme - Plaquetas. 2. Inflamação. 3. Moléculas de adesão celular. 4. Células endoteliais. 5. Citometria de fluxo. I. Conran, Nicola. II. Costa, Fernando Ferreira, 1950-. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

**Título em outro idioma:** Interactions between platelets from sickle cell anemia patients and human umbilical vein endothelial cells (HUVEC)

**Palavras-chave em inglês:**

Sickle cell anemia, platelets

Inflammation

Cell adhesion molecules

Endothelial cells

Flow cytometry

**Área de concentração:** Clínica Médica

**Titulação:** Doutora em Clínica Médica

**Banca examinadora:**

Nicola Amanda Conran Zorzetto [Orientador]

Margareteh Castro Ozelo

Erich Vinicius de Paula

Sandra Fátima Menosi Gualandro

Maria Stella Figueiredo

**Data de defesa:** 31-07-2013

**Programa de Pós-Graduação:** Clínica Médica

---

## BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE DOUTORADO

RENATA PROENÇA FERREIRA

---

---

Orientador (a) PROF(A). DR(A). NICOLA AMANDA CONRAN ZORZETTO

---

---

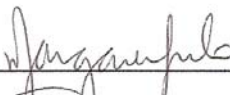
### MEMBROS:

---

1. PROF(A). DR(A). NICOLA AMANDA CONRAN ZORZETTO



2. PROF(A). DR(A). MARGARTEH CASTRO OZELO



3. PROF(A). DR(A). ERICH VINICIUS DE PAULA



4. PROF(A).DR(A). SANDRA FÁTIMA MENOSI GUALANDRO



5. PROF(A).DR(A). MARIA STELLA FIGUEIREDO



---

Programa de Pós-Graduação em Clínica Médica da Faculdade de Ciências Médicas da  
Universidade Estadual de Campinas

---

Data: 31 de julho de 2013

---



## AGRADECIMENTOS

---

São muitas pessoas para quem agradecer, porque uma tese de doutorado é humanamente impossível de ser realizada por uma única pessoa. Primeiramente, gostaria de agradecer a minha orientadora Dra Nicola pela amizade e grande oportunidade e sorte de trabalhar ao lado dela e por todos os ensinamentos, pois ela contribuiu diretamente para a minha formação profissional. Agradeço ao Dr Fernando que foi meu co-orientador, aos médicos e equipe de enfermagem responsável pelo atendimento e acompanhamento aos pacientes com anemia falciforme do Hemocentro da Unicamp e do Centro Infantil Boldrini. Aos pacientes e doadores que doaram sangue voluntariamente, e com isso possibilitou que este trabalho fosse realizado. Gostaria de agradecer aos funcionários do Hemocentro da Unicamp: Ana Leda, Irene, Janine, Ana Flávia, Lena, Simone, Ucha, Daniela, Maristela, Rosi, Adriana, Patrícia, Raquel, Ana Luísa, Teresa, Dilmara, Carla, Carolina, Andrey pela ajuda com equipamentos, reagentes, compras, suporte técnico e científico. Agradeço ao apoio financeiro que recebi da FAPESP. Aos alunos de pós-graduação Angélica, Daiana, Venina, Vanessa, Regiane, Cíntia, Fernanda, Tati, Emília, Carol, Flávia Pallis, Liciania, Telma e as pós-doc Camila, Boca, Taís, Flávia Lopes muito obrigada pela ajuda nos experimentos, pela amizade e companheirismo, pois agradeço muitíssimo por ter feito parte deste grupo. Gostaria de agradecer a minha família (Glória, Roberto, André, Marys, Augusto, Mariana) pelo incentivo e apoio, em especial a minha mãe Glória que sempre acreditou em mim e ajudou-me sempre que pode. E ao meu marido Lucas que esteve ao meu lado durante o doutorado, obrigada pelo apoio quando mais precisei, pelo amor, pela paciência, pois sem você eu não teria conseguido! Agradeço de coração a todos.



## RESUMO

---

A anemia falciforme (AF) é uma doença causada por uma mutação de ponto (troca do aminoácido glutâmico pela valina), que resulta na síntese de uma hemoglobina anômala, a hemoglobina S (HbS). A principal causa de morbidade para portadores de AF é a vaso-occlusão, que resulta da adesão anormal de células vermelhas e brancas ao endotélio, e consequentemente diminui o fluxo sanguíneo. As plaquetas de pacientes AF apresentam um aumento das suas propriedades adesivas, e por isso, sugere-se a sua participação no processo de vaso-occlusão. Nossos dados mostraram que essas plaquetas são capazes de ativarem células endoteliais, *in vitro*, em ensaios de co-culturas com células endoteliais de veia umbilical humana (HUVEC) com plaquetas. A expressão da molécula de adesão intercelular 1 (ICAM-1) e a da E-selectina das células HUVEC aumentou significativamente na sua superfície, após a sua co-incubação com plaquetas de pacientes AF. A ativação das moléculas de adesão depende do contato físico entre plaquetas e células HUVEC, pois a utilização de insertos de transwell inibiu significativamente a expressão de ICAM-1 e E-selectina na superfície das HUVEC. A co-incubação de plaquetas de pacientes AF com as células HUVEC resultou em uma maior produção e liberação de mediadores inflamatórios (citocinas); a interleucina 8 (IL-8) e da interleucina 1 beta (IL-1 $\beta$ ) quantificadas do sobrenadante das co-culturas com essas células. As plaquetas desses pacientes possuem propriedades inflamatórias, pois liberaram mais fator plaquetário 4 (PF4), uma quimiocina pró-agregante, quantificada do sobrenadante de cultura dessas plaquetas, em relação às plaquetas de indivíduos saudáveis. O aumento na expressão das moléculas de adesão, integrina  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 e P-selectina, na superfície das plaquetas de pacientes AF, podem indicar que há um aumento na sua ativação plaquetária, favorecendo a sua adesão ao endotélio inflamado.

O fator nuclear- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) é um fator de transcrição nuclear muito importante envolvido na ativação de genes, como genes que codificam de moléculas de adesão endotelial, e os nossos resultados de expressão gênica mostraram que há um aumento na expressão do gene *NF $\kappa$ B1A* (subunidade p50 do NF- $\kappa$ B), em associação com o aumento na expressão do gene *ICAM1* (que codifica a molécula de adesão ICAM-1) em HUVEC, após co-cultura dessas células com plaquetas de pacientes AF. A presença do inibidor BAY 11-



7082 (inibe a via de sinalização NF- $\kappa$ B), diminuiu a expressão das moléculas de adesão ICAM-1 e E-selectina na superfície das células HUVEC, quando co-incubadas com plaquetas de pacientes AF. Os nossos dados são importantes e corroboram com a nossa hipótese de que as plaquetas participam no processo de vaso-oclusão na anemia falciforme, pois apresentam a capacidade de ativar células endoteliais (*in vitro*) tornando-as inflamatórias e mais adesivas. Portanto, sugerimos que as plaquetas representam um importante alvo para novas abordagens terapêuticas na anemia falciforme.



## ABSTRACT

---

Sickle cell anemia (SCA) is a disease caused by a point mutation (causing the exchange of glutamic acid for valine), which results in the synthesis of an abnormal hemoglobin, hemoglobin S (HbS). The principal cause of morbidity in patients with SCA is vaso-occlusion, which results from the abnormal adhesion of red blood cells and white cells to blood vessel walls, leading to decreases in blood flow. Platelets from SCA patients present an increase in their adhesive properties and, therefore, we have previously suggested that they may participate in the vaso-occlusive process. Our current data show that platelets from SCA patients are able to activate endothelial cells, *in vitro*, in co-culture assays using Human Umbilical Vein Endothelial Cells (HUVEC) that were co-incubated with platelets from SCA patients. The expression of intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) and E-selectin was significantly increased on the surface of HUVEC cells after their co-incubation with platelets from SCA patients (SCA platelets). The activation of adhesion molecule expression observed depended on the physical contact between platelets and HUVEC cells, as transwell inserts were able to significantly inhibit the expression of ICAM-1 and E-selectin on HUVEC following their culture in the presence of SCA platelets. The co-incubation of SCA platelets with HUVEC cells also resulted in a higher production and release of inflammatory mediators (cytokines), such as interleukin 8 (IL-8) and interleukin 1 beta (IL-1 $\beta$ ) in the supernatant of these co-cultures. Platelets from SCA patients have inflammatory properties, releasing more platelet factor 4 (PF4), a pro-aggregating chemokine, than platelets from healthy subjects. The increased expression of the adhesion molecules, integrin  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 and P-selectin, on the surface of platelets from SCA patients, may also indicate an increased platelet activation, favoring their adhesion to the inflamed endothelium. Nuclear factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) is an important nuclear transcription

factor involved in the activation of genes, including endothelial adhesion molecules genes. We found an increased gene expression of NF $\kappa$ BIA (encoding the p50 subunit of NF- $\kappa$ B), in association with increased gene expression of ICAM1 (encodes ICAM-1) in HUVEC, following the co-culture of these cells with platelets from SCA patients. The presence of the BAY 11-7082 inhibitor (inhibits the NF- $\kappa$ B signaling pathway) decreased the expressions of the ICAM-1 and E-selectin adhesion molecules on the surface of



HUVEC cells when co-incubated with platelets from SCA patients. Our data corroborate our hypothesis that platelets probably participate in the process of vaso-occlusion in sickle cell anemia, since they have the ability to activate endothelial cells (in vitro), in turn, making them more inflammatory and adhesive. As such, we suggest that platelets represent an important target for new therapeutic approaches in sickle cell anemia.



## LISTA DE ABREVIATURAS

---

AF	Anemia Falciforme
ACD	Ácido Cítrico Dextrose
APC	<i>Allophycocyanin</i>
Arg	Argenina
AVC	Acidente Vascular Cerebral
BAC	Beta Actina
BAY 11-7082	(E) 3-[(4-Methylphenyl)sulfonyl]-2-propenenitrile - C <sub>10</sub> H <sub>9</sub> NO <sub>2</sub> S
CD106	Molécula de Adesão Vascular-1 (VCAM-1)
CD40L	Ligante para o CD40 (receptor da superfamília do TNF- $\alpha$ )
CD54	Molécula de Adesão Intercelular-1 (ICAM-1)
CD62E	E-selectina (molécula de adesão endotelial)
cDNA	Ácido Desoxirribonucleico complementar
CHUK	gene da proteína I $\kappa$ B $\alpha$ da via do NF- $\kappa$ B
CON	Controles (indivíduos saudáveis)
CRD	Domínios de Reconhecimento para Carboidrato
DMSO	Dimetil Sulfóxido
EDTA	Ácido Etilenodiaminotetraacético
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i> (imuno ensaio enzimático)
ET-1	Endotelina-1
FBS	<i>Fetal Bovine Serum</i> (soro bovino fetal)
FITC	<i>Fluorescein Isothiocyanate</i>
FT	Fator Tissular
FvW	Fator de <i>von Willebrand</i>
GAPDH	Gliceraldeído-3-Fosfato Desidrogenase
GM-CSF	Fator Estimulador de Colônia de Granulócito
GMPC	Guanosina Monofosfato cíclico
GPIb/IX/V	Glicoproteína do complexo Ib/IX/V
HbF	Hemoglobina Fetal
HbS	Hemoglobina S
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Performance



HU	Hidroxiurea
HUVEC	Células Endoteliais de Veia Umbilical Humana
<i>ICAM1</i>	gene da molécula de adesão intercelular-1
ICAM-1	Molécula de Adesão Intercelular-1
ICAM-4	Molécula de Adesão Intercelular-4
IL-1 $\beta$	Interleucina 1 beta
IL-8	Interleucina 8
<i>IKK<math>\beta</math></i>	gene da proteína quinase IKKB da via do NF- $\kappa$ B
MCP-1	Proteína Quimiotática de Monócito-1
MEC	Matriz Extracelular
MPP	Micropartícula de Plaqueta
NF- $\kappa$ B	Fator Nuclear kappa B
NO	Óxido Nítrico
NOS	Óxido Nítrico Sintetase
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i> (solução salina tamponada com fosfato)
PE	<i>Phycoerythrin</i>
PF4	Fator Plaquetário 4
plqs	plaquetas
PRP	Plasma Rico em Plaquetas
PS	Fosfatidilserina
qRT-PCR	Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real Quantitativo
<i>RelA</i>	gene da subunidade p65 do NF- $\kappa$ B
RNA	Ácido Ribonucleico
ROS	Espécies Reativas ao Oxigênio
SC-514	<i>(thienothienyl)amino-acetamide</i> - C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> N <sub>2</sub> OS <sub>2</sub>
SS	Pacientes com anemia falciforme
SSC/FSC	<i>Side Scatter/Forward Scatter</i>
TA	Temperatura Ambiente
STA	Síndrome Torácica Aguda
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TNF- $\alpha$	Fator de Necrose Tumoral alfa



VCAM-1	Molécula de Adesão Vascular-1
$\alpha_{IIb}\beta_3$	Integrina alfa IIb beta 3 (GPIIb/IIIa, receptor para fibrinogênio)
$\alpha_4\beta_1$	Integrina alfa 4 beta 1 (VLA-4, receptor para VCAM-1 e fibronectina)
$\alpha_V\beta_3$	Integrina alfa V beta 3 (receptor para vitronectina)
$\alpha_2\beta_1$	Integrina alfa 2 beta 1 (GPIa/IIa; receptor para o colágeno)



## LISTA DE TABELAS

---

<b>Tabela I:</b> Padronização da concentração de extrato nuclear para a subunidade da p50 (NF- $\kappa$ B); kit de ELISA.....	76
<b>Tabela II:</b> Perfil clínico, hematológico e demográfico dos indivíduos controles (CON) e pacientes com anemia falciforme (SS) que participaram deste estudo. ....	80



## LISTA DE FIGURAS

**FIGURA 1:** A fisiopatologia da anemia falciforme. A mutação no gene da globina  $\beta$  leva a formação da HbS que quando desoxigenada, causa alterações celulares e manifestações clínicas. (STEINBERG M H. *TRENDS in Pharmacological Sciences*, 2006). ..... 40

**FIGURA 2:** Etapas da vaso-oclusão na anemia falciforme. Algumas hipóteses sugerem que as principais vasculopatias na anemia falciforme, como as úlceras de perna, priapismo, hipertensão pulmonar e o AVC estão associados aos baixos níveis de Hb e ao aumento da hemólise intravascular (lado esquerdo da figura). Essas complicações são resultados de uma disfunção endotelial, devido ao sequestro do NO pela Hb livre, e produção de ROS. O processo da hemólise, associada à disfunção endotelial, causa um desequilíbrio hemostático em portadores de AF. As complicações clínicas como as crises vaso-oclusivas acompanhadas de dores, a STA, necrose vascular de cabeça de fêmur e retinopatia estão associadas à leucocitose, aumento da expressão de moléculas de adesão e hemólise intravascular, que contribuem para o aumento da adesão de hemácias, leucócitos e plaquetas ao endotélio, levando a vaso-oclusão. (GLADWIN M T, VICHINSKY E., *The New England Journal of Medicine*, 2008). ..... 45

**FIGURA 3:** Interações entre plaquetas e endotélio. .... 50

**FIGURA 4:** Esquema da via de ativação do fator de transcrição nuclear- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B). Quando sinais extracelulares como citocinas, UV (radiação ultravioleta), vírus ou bactérias são emitidos, a proteína quinase IKK $\alpha$  ou IKK $\beta$  é ativada, podendo fosforilar a proteína inibitória I $\kappa$ B $\alpha$ , a qual se desprende do heterodímero (p50/p65). O heterodímero, quando liberado, torna-se ativo e é translocado para o núcleo da célula ligando-se à sítios promotores de genes: genes que codificam moléculas de adesão, citocinas e até mesmo o próprio NF- $\kappa$ B (CHEN F *et al.*, *Clinical Chemistry*, 1999). ..... 52

**FIGURA 5:** Biochips para ensaios de adesão em fluxo utilizados na Plataforma VenaFluxTM® (Cellix, Irlanda). (A) Vena8; biochip de 8 canais de 400  $\mu$ m (diâmetro) para proteínas recombinantes; (B) VenaEC; biochip de 2 canais para células endoteliais de 600  $\mu$ m (diâmetro). Imagem do site: <http://www.cellixltd.com/index.php/products/biochips>. ..... 65

**FIGURA 6:** Análise da adesão de plaquetas em condições de fluxo através do software DucoCell (Cellix, Irlanda). Adesão de plaquetas de CON (5x10<sup>6</sup> plqs/mL) ao FB (50  $\mu$ g/mL), durante 3 min; 0,3 dyne/cm<sup>2</sup>; 37°C; aquisição de 3 imagens por canal. As imagens circuladas em azul são plqs aderidas por 0,01 mm<sup>2</sup> e a análise é baseada nos seguintes parâmetros, para cada plqs: área, perímetro e nível de contraste. .... 66

**FIGURA 7:** Modelo de co-cultura de células endoteliais com plaquetas, em contato direto ou com suportes de transwell. Experimentos realizados em placas de 6 poços (representado 1 poço por modelo), com células endoteliais aderidas ao fundo do poço, e uma suspensão de plaquetas lavadas em contato direto com as células endoteliais, ou no compartimento superior dos suportes de transwells ..... 68

**FIGURA 8:** Expressão das moléculas de adesão  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 ativada (anti-PAC-1) e P-selectina (anti-CD62P) na superfície das plaquetas de indivíduos saudáveis (plqs CON) e de pacientes AF (plqs SS). Amostras de plasma rico em plaquetas (PRP) foram separados de



sangue periférico de indivíduos saudáveis ( $n \geq 18$ ) e pacientes AF ( $n=32$ ), e marcados com os anticorpos PAC-1 (FITC) que reconhece a  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 em estado ativado; e/ou CD62P (FITC), 20min, TA, e a fluorescência foi avaliada através da citometria de fluxo. (A) expressão da integrina  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 em estado ativado,  $p < 0,05$ ; (B) expressão da P-selectina,  $p > 0,05$ ; teste Mann Whitney. .... 81

**FIGURA 9:** Adesão plaquetas de indivíduos saudáveis (plqs CON) e pacientes com AF (plqs SS) avaliado por ensaio de adesão microfluidica. Fluxo de 0,3 dyne/cm<sup>2</sup>; 3min, 37°C; canais de 400  $\mu$ m. (A) Adesão ao FB (50  $\mu$ g/mL) e (B) adesão ao Col (10  $\mu$ g/mL); plqs CON ( $n=5$ ) e plqs SS ( $n=11$ );  $5 \times 10^6$  plqs/mL; teste Mann-Whitney ( $p > 0,05$ ). .... 82

**FIGURA 10:** Adesão de plaquetas de indivíduos controles (plqs CON) e de pacientes com AF (plqs SS) em monocamadas de células endoteliais (HUVEC), sob condições estáticas. Monocamadas de HUVEC ( $3 \times 10^4$  céls/mL) foram cultivadas em placas de 96 poços, pré-estimuladas ou não com TNF- $\alpha$  (10 ng/mL; 3h, 37°C, 5% CO<sub>2</sub>). Subsequentemente, plqs CON ( $n=14$ ) e plqs SS ( $n=24$ ) na concentração de  $1 \times 10^8$  plqs/mL foram adicionadas aos poços com a monocamada e incubadas por 1h, 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. A adesão foi calculada em porcentagem (%) de plqs aderidas. Testes não-paramétrico *Mann-Whitney* (não pareado;  $p > 0,05$ ) e *Wilcoxon* (pareado;  $p > 0,05$ ) ..... 83

**FIGURA 11:** Expressão das moléculas de adesão ICAM-1 (A), E-selectina (B) e VCAM-1 (C) na superfície das HUVEC, após à co-cultura com plaquetas de indivíduos controles (plqs CON) ou pacientes AF (plqs SS). Co-cultura de HUVEC ( $1 \times 10^6$  céls/poço) com plqs CON ( $n=17$ ) ou plqs SS ( $n=32$ );  $1 \times 10^8$  plqs/poço; 4h, 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Pré-incubação das HUVEC com TNF- $\alpha$  (10 ng/mL; 3h, 37°C, 5% CO<sub>2</sub>;  $n=15$ ). Expressões de ICAM-1 (anti-CD54-PE), E-selectina (anti-CD62E-APC) e VCAM-1 (anti-CD106-FITC), na superfície das HUVEC, foram avaliadas por citometria de fluxo. \*\* $p < 0,01$  e \*\*\* $p < 0,001$  comparados às expressões basais ( $n=16$ ). Teste ANOVA ( $p < 0,0001$ ); não pareado e não paramétrico *Kruskal-Wallis*. .... 85

**FIGURA 12:** Expressão das moléculas de adesão ICAM-1 e E-selectina na superfície das HUVEC, após à co-cultura com plaquetas na presença e ausência de suportes de *transwell*. Co-cultura de HUVEC ( $1 \times 10^6$  céls/poço) com plqs CON ( $n=9$ ) e plqs SS ( $n=15$ );  $1 \times 10^8$  plqs/poço (4h, 37°C, 5% CO<sub>2</sub>), com e sem suportes de *transwell* (0,4  $\mu$ m). As expressões de ICAM-1 (anti-CD54-PE) e E-selectina (anti-CD62E-APC) nas HUVEC foram avaliadas por citometria de fluxo. (A) Expressão de ICAM-1, \* $p < 0,05$  e \*\*\* $p < 0,001$  comparados à expressão basal; ## $p < 0,01$  comparados ao sem *transwell*. (B) Expressão de E-selectina; \* $p < 0,05$  comparado à expressão basal; ## $p < 0,01$  comparado ao sem *transwell*. Testes não paramétricos *Wilcoxon* (pareado) e ANOVA ( $p < 0,001$ ), *Kruskal-Wallis* (não pareado)..... 87

**FIGURA 13:** Níveis de IL-8 do sobrenadante de cultura de plaquetas e do sobrenadante de co-cultura de HUVEC com plaquetas. (A) Níveis de IL-8 (ng/mL) quantificados do sobrenadante de plaquetas ( $1 \times 10^8$  plqs/poço); plqs CON ( $n=13$ ) e plqs SS ( $n=22$ ) por ELISA, após 4h, 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. HUVEC também foram pré-estimuladas com TNF- $\alpha$  (10 ng/mL; 3h, 37°C, 5% CO<sub>2</sub>), ( $p > 0,05$ ). (B) Níveis de IL-8 (ng/mL) do sobrenadante de co-culturas de HUVEC ( $1 \times 10^6$  cél/poço) com plaquetas ( $1 \times 10^8$  plqs/poço), \*\*\* $p < 0,001$



comparado aos níveis basais (n=24); +++p<0,001 comparado com todos os grupos (n=24); plqs CON (n=26) e plqs SS (n=44). Testes não-paramétricos *Mann-Whitney* (não pareado) e ANOVA (p<0,001) *Kruskal-Wallis* (não pareado)..... 89

**FIGURA 14:** Níveis de IL-1 $\beta$  do sobrenadante de cultura de plaquetas e do sobrenadante de co-culturas de HUVEC com plaquetas. (A) Níveis de IL-1 $\beta$  (pg/mL) do sobrenadante de plaquetas (1x10<sup>8</sup> plqs/poço) e determinado por ELISA, após 4h, 37°C, 5% CO<sub>2</sub>; HUVEC também foram pré-estimuladas com TNF- $\alpha$  (10 ng/mL; 3h, 37°C, 5% CO<sub>2</sub>); plqs CON (n=16) e plqs SS (n=29). (B) Níveis de IL-1 $\beta$  (pg/mL) quantificados do sobrenadante de co-culturas de HUVEC (1x10<sup>6</sup> cél/poço) com plaquetas (1x10<sup>8</sup> plqs/poço); \*\*p<0,01 comparado aos níveis basais (n=24); #p<0,05 comparado ao TNF- $\alpha$  (n=24); plqs CON (n=25) e plqs SS (n=43). Testes não-paramétricos *Mann-Whitney* (não pareado) e ANOVA (p=0,02) *Kruskal-Wallis* (não pareado)..... 91

**FIGURA 15:** Níveis de PF4 do sobrenadante de plaquetas incubadas por 4h. Níveis de PF4 (pg/mL) do sobrenadante de culturas de plaquetas lavadas (placas de 6 poços; 1x10<sup>8</sup> plqs/poços) quantificados por ELISA, após 4h, 37°C, 5% CO<sub>2</sub>; plqs CON (n=8) e plqs SS (n=22). Teste não paramétrico *Mann-Whitney* (não pareado p>0,9)..... 92

**FIGURA 16:** Expressão relativa dos genes *ICAM1* (A), *NFkBIA* (B), *RelA* (C), *CHUK* (D) e *IKK $\beta$*  (E) em HUVEC, após à co-cultura com plaquetas. HUVEC (1x10<sup>6</sup> céls/poço) foram co-incubadas ou não com plaquetas lavadas (1x10<sup>8</sup> plqs/poço); plqs CON (n=10) e plqs SS (n=25) 4h, 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. HUVEC também foram pré-estimuladas com TNF- $\alpha$  (10 ng/mL, 3h, 37°C, 5% CO<sub>2</sub>). Expressão gênica (U.A.) avaliada por qRT-PCR em relação a expressão dos genes endógenos calibradores *GAPDH* e *BAC*; \*p<0,05 comparada à expressão basal (n=12); +++p<0,001 comparado à todos os grupos (n=12). Teste não paramétrico ANOVA (p<0,0001), *Kruskal-Wallis* (não pareado). ..... 94

**FIGURA 17:** O efeito do inibidor da via NF- $\kappa$ B, BAY 11-7182, na expressão das moléculas de adesão ICAM-1 (A) e E-selectina (B), em co-culturas de HUVEC com plaquetas. HUVEC foram pré-incubadas com BAY 11-7082 (20  $\mu$ M), durante 30min (37°C, 5% CO<sub>2</sub>), e em seguida, incubadas na presença ou não de plqs CON (n=20) ou plqs SS (n=22) por 4h (37°C, 5% CO<sub>2</sub>). (A) Expressão de ICAM-1 (anti-CD54-PE) e de (B) E-selectina (anti-CD62E-APC) avaliadas por citometria de fluxo; \*p<0,05 e \*\*p<0,01 comparado à expressão basal (n=22); #p<0,05 e ###p<0,01 comparados à expressão sem o uso do inibidor. Testes não paramétricos ANOVA (p<0,01), *Kruskal-Wallis* (não pareado) e *Wilcoxon* (pareado)..... 96

**FIGURA 18:** O efeito do inibidor da via NF- $\kappa$ B, SC-514, na expressão das moléculas de adesão ICAM-1 (A) e E-selectina (B), em co-culturas de HUVEC com plaquetas. HUVEC foram pré-incubadas com SC-514 (SC; 1  $\mu$ M), durante 30min (37°C, 5% CO<sub>2</sub>), e em seguida, incubadas na presença de plqs CON (n=20) ou plqs SS (n=22) por 4h (37°C, 5% CO<sub>2</sub>). (A) Expressão de ICAM-1 (anti-CD54-PE) e de (B) E-selectina (anti-CD62E-APC) avaliadas por citometria de fluxo; \*p<0,05 e \*\*p<0,01 comparado à expressão basal (n=22). Testes não paramétricos ANOVA (p<0,01), *Kruskal-Wallis* (não pareado) e *Wilcoxon* (pareado)..... 98

**FIGURA 19:** Atividade da p50 e da p65 em células endoteliais após à co-cultura com plaquetas, com ou sem suportes de *transwell*. HUVEC (1x10<sup>6</sup> céls/poço) foram co-incubadas ou não com plaquetas (1x10<sup>8</sup> plqs/poço) com ou sem suportes de *transwell* (poro



da membrana de 0,4  $\mu\text{m}$ ) 4h, 37°C, 5%  $\text{CO}_2$ . HUVEC também foram pré-estimuladas com  $\text{TNF-}\alpha$  (10ng/mL, 3h, 37°C, 5%  $\text{CO}_2$ ). A atividade das proteínas nucleares p50 e p65 foram mensuradas por ELISA. (A) atividade da p50; \*\*p<0,01 comparado ao basal; #p<0,05 comparado ao sem *transwell*; (B) atividade da p65; \*\*p<0,01 comparado ao basal; plqs CON (n $\geq$ 2) e plqs SS (n=6), teste não-paramétrico ANOVA p=0,009 Kruskal-Wallis (não-pareado) e Wilcoxon (pareado). ..... 100



# SUMÁRIO

---

RESUMO.....	ix
ABSTRACT.....	xiii
LISTA DE ABREVIATURAS .....	xvii
LISTA DE TABELAS .....	xxiii
LISTA DE FIGURAS .....	xxv
SUMÁRIO .....	xxxiii
1. INTRODUÇÃO.....	37
1.1- Hemoglobina Fetal.....	41
1.2- Tratamento da anemia falciforme.....	41
1.2.1- Hidroxiureia .....	41
1.2.2- Terapêutica transfusional.....	42
1.2.3- Transplante de medula óssea.....	43
1.3- Processo de vaso-oclusão na anemia falciforme .....	43
1.4- Anemia falciforme como uma doença inflamatória crônica.....	44
1.5- O Endotélio e a inflamação na anemia falciforme .....	46
1.6- Plaquetas.....	47
1.7- Adesão das plaquetas à parede vascular .....	48
1.8- O fator de transcrição nuclear- $\kappa$ B e a ativação de células endoteliais.....	51
2. JUSTIFICATIVA.....	53
3. OBJETIVOS .....	57
3.1- Geral.....	59
3.2- Específicos .....	59
3.2.1- Investigar se as plaquetas de pacientes AF induzem a expressão de moléculas de adesão na superfície endotelial. ....	59
3.2.2- Avaliar a adesão de plaquetas de pacientes AF, em condições de fluxo e estáticas.....	59
3.2.3- Quantificar mediadores inflamatórios: plaquetas de pacientes AF e células endoteliais, <i>in vitro</i> .....	59
3.2.4- Analisar o efeito das plaquetas de pacientes AF na expressão de genes de ativação endotelial.....	59
3.2.5- Investigar a participação da via NF- $\kappa$ B na ativação endotelial induzida por plaquetas de pacientes AF. ....	59
4. CASUÍSTICA E MÉTODOS.....	61
4.1- Pacientes.....	63
4.2- Separação de plaquetas .....	64
4.3- Ensaio de adesão em fluxo com plaquetas – Cellix: VenaFluxTM.....	64
4.4- Cultura de Células Endoteliais de Veia Umbilical Humana – HUVEC .....	66
4.5- Ensaio de adesão estática de plaquetas com HUVEC.....	67
4.6- Co-cultura de HUVEC com plaquetas .....	69
4.7- Co-cultura com insertos de transwell.....	70
4.8- Citometria de fluxo: plaquetas.....	71
4.9- Citometria de fluxo: HUVEC.....	72
4.10- Tratamento das HUVEC com inibidores de NF- $\kappa$ B .....	72
4.11- Quantificação das citocinas do sobrenadante de cultura e co-cultura.....	73



4.12- Extração de RNA e síntese de cDNA .....	73
5. RESULTADOS .....	77
5.1- Grupo de pacientes e controles .....	79
5.2- As plaquetas de pacientes AF circulam em estado ativado .....	79
5.3- Avaliação da adesão de plaquetas sob condição de fluxo .....	81
5.4- Adesão de plaquetas de pacientes AF a uma monocamada de células endoteliais de veia umbilical humana (HUVEC), em condições estáticas, na presença ou não de TNF- $\alpha$ .....	82
5.5- A co-incubação de células endoteliais com plaquetas de pacientes AF aumenta a expressão das moléculas de adesão ICAM-1 e E-selectina na superfície endotelial .....	83
5.6- O aumento da expressão das moléculas de adesão ICAM-1 e E-selectina, in vitro, ocorre através do contato direto entre plaquetas de pacientes AF e células endoteliais .....	86
5.7- As plaquetas de indivíduos AF induzem um aumento na produção de IL-8 por células endoteliais .....	88
5.8- Células endoteliais induzem um aumento na produção de IL-1 $\beta$ pelas plaquetas de pacientes AF .....	90
5.9- As plaquetas de pacientes AF liberam o fator plaquetário 4 (PF4), in vitro	92
5.10- O efeito das plaquetas de pacientes AF na expressão de genes associados à ativação endotelial .....	92
5.11- Participação da via NF- $\kappa$ B na ativação de células endoteliais por plaquetas de pacientes AF .....	95
5.12- Resultados preliminares: ativação do NF- $\kappa$ B endotelial após co-cultura com plaquetas .....	99
6. DISCUSSÃO .....	101
7. CONCLUSÃO .....	111
8.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	115
9. ANEXOS .....	127
10. APÊNDICE .....	133
10.1- Apêndice I: Artigo em fase de elaboração (pré-submissão).....	135
10.2- Apêndice II: Artigo publicado em 5 de fevereiro de 2010. ....	163

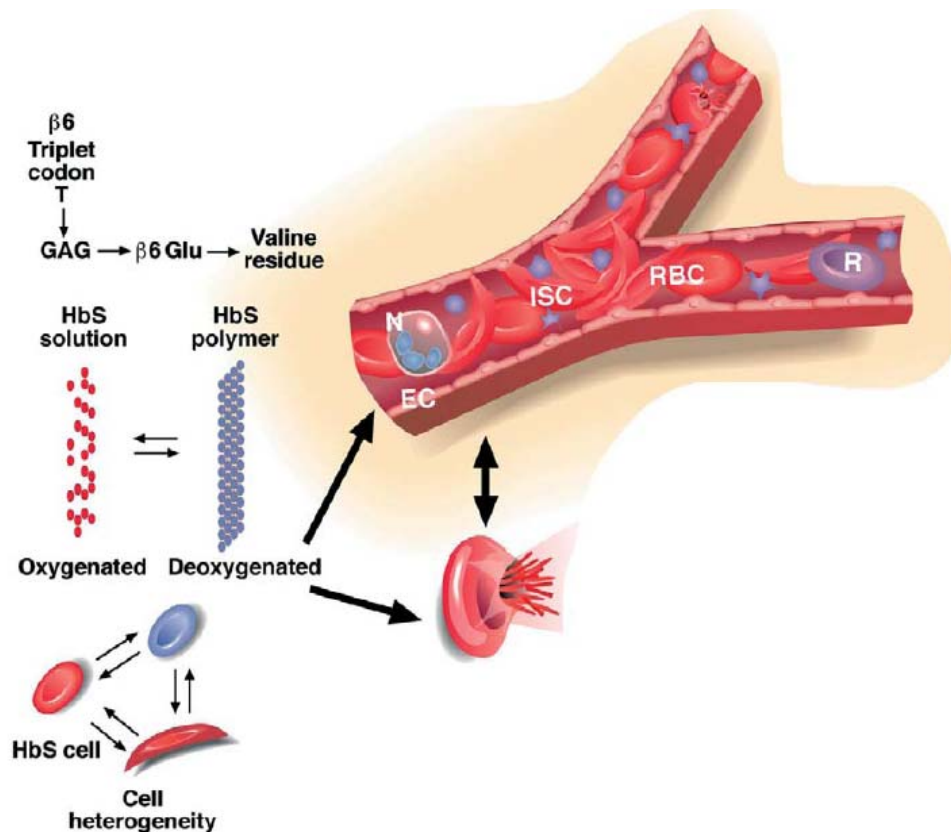


# ***1. INTRODUÇÃO***

---



A anemia falciforme (AF) originou-se na África, e foi trazida às Américas pela imigração forçada dos escravos e atualmente é encontrada em toda a Europa e em grandes regiões da Ásia. No Brasil, a prevalência da AF é variável, sendo mais frequente na região nordeste, onde a população de indivíduos da raça negra na população é maior (Cardoso & Guerreiro 2006). A AF é uma doença genética hereditária, causada por uma mutação de ponto que envolve a troca do aminoácido ácido glutâmico pela valina, na sexta posição da cadeia polipeptídica da  $\beta$ -globina, que resulta na síntese de uma hemoglobina anômala e instável, a hemoglobina S (HbS) (STUART & NAGEL 2004), **(FIGURA 1)**. A HbS, quando desoxigenada, forma polímeros no interior da célula vermelha causando deformação, enrijecimento e fragilização das mesmas. Além disso, devido à hemólise intravascular, os portadores dessa doença desenvolvem uma anemia grave crônica e podem sofrer episódios de vaso-oclusão ao longo da vida, que causam um aumento na susceptibilidade à infecção, as quais são responsáveis por grande parte da morbidade e mortalidade dos pacientes. Outras manifestações clínicas que podem ocorrer em decorrência da doença são: lesão de tecidos e órgãos devido a hipóxia e vaso-oclusão, sequestro esplênico, síndrome torácica aguda (STA), hipertensão pulmonar, priapismo, retinopatia, úlcera de perna e necrose de cabeça de fêmur.



**FIGURA 1: A fisiopatologia da anemia falciforme.** A mutação no gene da globina  $\beta$  leva a formação da HbS que quando desoxigenada, causa alterações celulares e manifestações clínicas. (STEINBERG M H. *TRENDS in Pharmacological Sciences*, 2006).  $\beta 6$  triplet códon (cadeia globina beta-6); valine residue (resíduo de valina); T=timina; G=guanina; A=adenina; HbS solution (hemoglobina S solúvel); HbS polymer (polímero de hemoglobina S); oxygenated (oxigenada); deoxygenated (deoxigenada); HbS cell (célula com hemoglobina S); cell heterogeneity (heterogeneidade celular); N=neutrófilo; EC=célula endotelial; ISC (célula irreversivelmente falcizada); RBC=célula vermelha; R=reticulócito

### **1.1- Hemoglobina Fetal**

A hemoglobina fetal (HbF) é uma molécula formada pela combinação de 2 cadeias de  $\alpha$ -globina e 2 cadeias de  $\gamma$ -globina (BUNN & FORGET 1986). A cadeia de  $\gamma$ -globina é produzida em altos níveis em células eritróides durante a fase embrionária, porém, após o nascimento ocorre o “switching” de hemoglobina, ou seja, a  $\gamma$ -globina é substituída pela produção de  $\beta$ -globina (AMOYAL & FIBACH 2007). A síntese de HbF inibe a polimerização da HbS e, conseqüentemente, a falcização das células vermelhas, diminuindo os sintomas da AF (SERJEANT 2001). O aumento significativo dos níveis de HbF normalmente proporciona uma melhora clínica para os pacientes com AF, fato observado entre alguns pacientes que apresentam naturalmente níveis elevados de HbF (ROSSE *et al.*, 2000), tornando-se assim, uma possível estratégia terapêutica para pacientes portadores dessa doença.

### **1.2- Tratamento da anemia falciforme**

#### **1.2.1- Hidroxiureia**

A hidroxiurea (HU) é uma droga que inibe o ciclo celular, e é utilizada no tratamento de doenças mieloproliferativas (CHARACHE *et al.*, 1995). Na AF, a HU aumenta os níveis de HbF, reduz a polimerização da HbS, a neutrofilia e algumas complicações associadas ao processo de vaso-oclusão (LASSMANN *et al.*, 1992, YARBRO *et al.*, 1992). A capacidade da HU em aumentar os níveis de HbF varia entre os pacientes. Muitos deles apresentam melhora clínica antes mesmo de exibir um aumento significativo dos níveis de HbF (HALSEY *et al.*, 2003, KING 2004). Alguns estudos demonstraram que a HU pode beneficiar os pacientes através de outros mecanismos, como a diminuição na expressão de moléculas de adesão na superfície das células (OKPALA 2006), redução da contagem de neutrófilos e eosinófilos (CHARACHE *et al.*, 1995, CANALLI *et al.*, 2004), diminuição das propriedades adesivas em hemácias (GAMBERO *et al.*, 2007), e plaquetas (PROENÇA-FERREIRA *et al.*, 2010), redução das crises vaso-oclusivas e de dores (CHARACHE *et al.*, 1995), diminuição da necessidade de transfusão, além de diminuir a mortalidade e morbidade desses pacientes (STEINBERG *et al.*, 2003). RODRIGUEZ e colaboradores (1998) relataram que a farmacodinâmica da HU possibilita que ela seja uma

doadora de óxido nítrico (NO) e também uma estimuladora da produção de NO, com tempo de meia vida de 6 horas. GLADWIN e colaboradores (2002) relataram que a terapia com HU promove a geração intravascular e intraeritrocitária de NO, e é esse aumento o responsável por elevar os níveis de HbF. O aumento de NO pela HU estaria associado ao aumento dos níveis de guanosina de monofosfato cíclico (GMPc), sugerindo a presença de uma via mediada por NO na indução da expressão do gene  $\gamma$ -globina, e consequentemente aumentando a síntese de HbF (COKIC *et al.*, 2003).

### **1.2.2- Terapêutica transfusional**

Pacientes com anemia falciforme são bastante tolerantes à anemia crônica, necessitando de transfusões somente em circunstâncias especiais, como por exemplo, crise de sequestro esplênico ou hepático, acidente vascular cerebral, preparação para cirurgia, gravidez, hipóxia com síndrome torácica aguda e priapismo (COSTA 2004, STEINBERG 1999). A transfusão simples de concentrado de hemácias pode ser utilizada no caso de piora da anemia, que pode ocorrer especialmente durante o tratamento das crises álgicas por vaso-oclusão. Outras duas modalidades de transfusões feitas eventualmente podem ser utilizadas: a exsanguíneotransfusão ou troca sanguínea manual, em que o paciente é submetido a sangrias terapêuticas e transfusões sucessivas; e a eritrocitaférese ou troca automatizada das hemácias, por meio de uma máquina de aférese que substitui apenas o componente eritrocitário do sangue mediante separação por centrifugação. Ambas podem ser utilizadas, principalmente, quando o paciente apresenta complicações como acidente vascular cerebral (AVC) e síndrome torácica aguda (STA), em que há a necessidade de diluir os níveis de HbS e corrigir os níveis de saturação de O<sub>2</sub>. Os programas regulares de transfusão também são uma alternativa para os pacientes que não respondem a hidroxiureia, e são indicadas na prevenção do AVC em pacientes de alto risco, na manutenção dos pacientes após AVC, insuficiências cardíacas, entre várias indicações (ARAÚJO 2007).

### **1.2.3- Transplante de medula óssea**

O tratamento para portadores de AF consiste no controle dos sintomas e na prevenção das principais manifestações clínicas (STA, AVC, crises vaso-oclusivas) ao longo da vida, através da terapia com HU (aumenta os níveis de HbF e diminui a hemólise intravascular) ou transfusões sanguíneas para controlar a anemia. Atualmente, a única opção que representaria a cura dessa doença seria o transplante de medula óssea (células tronco hematopoéticas), e o primeiro caso reportado foi em 1984 (JOHNSON *et al.*, 1984). Entretanto, o transplante envolve diversos riscos como a rejeição, e a dificuldade de encontrar um doador compatível (entre irmãos apenas). Alguns autores sugerem como candidatos ao transplante apenas os pacientes mais graves, que já tenham apresentado várias crises vaso-oclusivas anuais, assim como lesão de órgãos e tecidos (pulmão, rim, retinopatia, osteonecrose, priapismo), hospitalizações recorrentes (infecções), ou quando não há benefício algum com a terapia com HU (KRISHNAMURTI 2007).

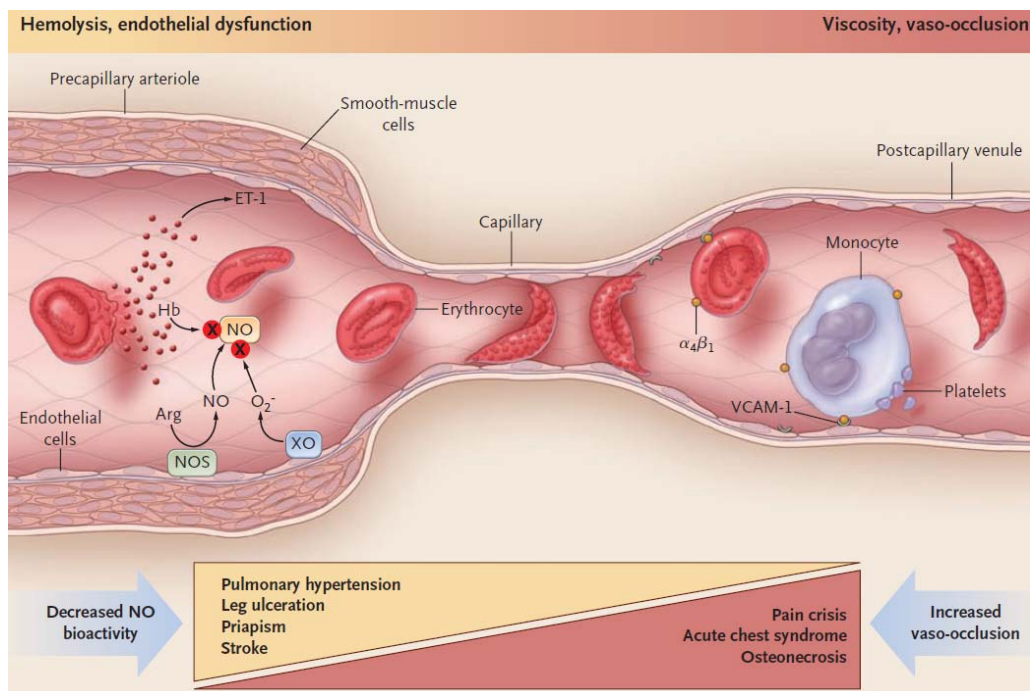
### **1.3- Processo de vaso-oclusão na anemia falciforme**

A vaso-oclusão é um processo que envolve várias etapas. Eventos vasos-oclusivos são iniciados pela adesão anormal de células vermelhas e brancas ao endotélio e interações de diversos tipos de células (interações heterocelulares). Essas interações podem ser mediadas, principalmente, através da ativação das vias de sinalização dessas células (estímulos inflamatórios) e pelo aumento da atividade e expressão de moléculas de adesão na superfície das células endoteliais, células vermelhas e leucócitos (HILLERY *et al.*, 2000, STUART & NAGEL 2004, ASSIS *et al.*, 2005, GAMBERO *et al.*, 2007, CANALLI *et al.*, 2008, CONRAN & COSTA 2009). Além disso, a diminuição da biodisponibilidade do NO e o aumento na liberação de endotelina-1 (ET-1) favorecem a vasoconstrição, contribuindo assim com os eventos vasos-oclusivos. O NO é um gás solúvel com meia vida de alguns segundos, tornando-se uma substância de grande interesse devido, principalmente, pelos efeitos benéficos na manutenção do tônus muscular e prevenção da agregação plaquetária, através do aumento do GMPc e diminuição do cálcio intraplaquetário (NATHAN 1992). Estes acontecimentos prolongam o tempo de trânsito das células vermelhas na microvasculatura, contribuindo assim com a polimerização da

HbS devido à desoxigenação das hemácias e o eventual bloqueio do vaso. O aumento da concentração intracelular de HbS, a diminuição do pH sanguíneo, a liberação de espécies reativas de oxigênio (ROS) e a ativação da cascata de coagulação com geração secundária de trombina, contribuem para o processo de vaso-oclusão (HEAD *et al.*, 1997), (FIGURA 2). Novas evidências indicam que as plaquetas tem um papel no processo vaso-oclusivo (PROENÇA-FERREIRA *et al.*, 2010). Recentemente, identificamos um aumento da expressão das moléculas de adesão, a integrina  $\alpha_{IIb}\beta_3$  e P-selectina, na superfície das plaquetas de pacientes com AF, sugerindo que o aumento das propriedades adesivas das plaquetas contribuem com o processo da vaso-oclusão (PROENÇA-FERREIRA *et al.*, 2010).

#### **1.4- Anemia falciforme como uma doença inflamatória crônica**

A obstrução e lesão do endotélio e dos tecidos desencadeiam uma resposta inflamatória que, por sua vez, leva ao estado inflamatório crônico em pacientes com AF, caracterizado por alterações significativas no repertório de citocinas inflamatórias e fatores de crescimento. Tais citocinas, como a interleucina 6 (IL-6), interleucina 8 (IL-8), fator- $\alpha$  de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ) e o fator estimulador de colônia de macrófago-granulócito (GM-CSF) são encontrados em níveis elevados em pacientes com AF (DUITS *et al.*, 1996, CROIZAT *et al.*, 1999, CONRAN *et al.*, 2007, LANARO *et al.*, 2008). Níveis elevados dessas citocinas contribuem com a fisiopatologia da doença, como por exemplo, na ativação dos leucócitos e mudança na produção e migração das células brancas da medula óssea (PLATT 2000). Na AF, a resposta inflamatória está associada à ativação endotelial e, possivelmente, à ativação de células vermelhas, leucócitos e plaquetas. Por sua vez, a adesão das células sanguíneas ao endotélio é induzida e perpetua o estado inflamatório.



**FIGURA 2: Etapas da vaso-oclusão na anemia falciforme.** Algumas hipóteses sugerem que as principais vasculopatias na anemia falciforme, como as úlceras de perna, priapismo, hipertensão pulmonar e o AVC estão associados aos baixos níveis de Hb e ao aumento da hemólise intravascular (lado esquerdo da figura). Essas complicações são resultados de uma disfunção endotelial, devido ao sequestro do NO pela Hb livre, e produção de ROS. O processo da hemólise, associada à disfunção endotelial, causa um desequilíbrio hemostático em portadores de AF. As complicações clínicas como as crises vaso-oclusivas acompanhadas de dores, a STA, necrose vascular de cabeça de fêmur e retinopatia estão associadas à leucocitose, aumento da expressão de moléculas de adesão e hemólise intravascular, que contribuem para o aumento da adesão de hemácias, leucócitos e plaquetas ao endotélio, levando a vaso-oclusão. (GLADWIN M T, VICHINSKY E., *The New England Journal of Medicine*, 2008). *Hemolysis, endothelial dysfunction* (hemólise, disfunção endotelial); *viscosity, vaso-occlusion* (viscosidade, vaso-oclusão); *precapillary arteriole* (arteríola pré-capilar); *smooth-muscle cells* (células do músculo liso); *capillary* (capilar); *postcapillary venule* (vênula pós-capilar); *endothelial cells* (células endoteliais); *Arg*=argenina; *NOS*=óxido nítrico sintetase; *O<sub>2</sub><sup>-</sup>* (superóxido); *XO* (xantina oxidase); *erythrocyte* (eritrócito); *α<sub>4</sub>β<sub>1</sub>* (integrina alfa 4 beta 1; ligante para VCAM-1); *VCAM-1* (molécula de adesão celular vascular-1); *monocyte* (monócito); *platelets* (plaquetas); *decreased NO bioactivity* (bioatividade do óxido nítrico diminuída); *pulmonary hypertension* (hipertensão pulmonar); *leg ulceration* (úlceras de perna); *priapism* (priapismo); *stroke* (acidente vascular cerebral); *pain crisis* (crises de dor); *acute chest syndrome* (síndrome torácica aguda); *osteonecrosis* (osteonecroses); *increased vaso-occlusion* (aumento da vaso-oclusão).

### 1.5- O Endotélio e a inflamação na anemia falciforme

As células que compõe o endotélio formam uma barreira semipermeável que permite a passagem livre de moléculas e de células, entre o sangue e o tecido. As células endoteliais exercem múltiplas funções, como o controle da coagulação sanguínea, manutenção do tônus vascular, participação na resposta inflamatória e na formação de novos vasos sanguíneos (GALLEY & WEBSTER 2004, POBBER *et al.*, 2009), além da produção de proteínas que participam diretamente na hemostasia (fatores antitrombóticos e de coagulação). Existem receptores na superfície endotelial denominada de moléculas de adesão classificados em integrinas, superfamília de imunoglobulina e selectinas, que promovem a adesão de células sanguíneas. As integrinas são compostas por duas cadeias,  $\alpha$  e  $\beta$ , e a mais importante no endotélio é a  $\alpha_v\beta_3$  que é receptora para vitronectina, fibronectina, fibrinogênio, trombospondina, fator de *von Willebrand* (FvW) e molécula de adesão intercelular-4 (ICAM-4), (HYNES 1992). A superfamília de imunoglobulinas, presentes nas células endoteliais, é composta pela molécula de adesão intercelular-1 (ICAM-1), que medeia a adesão de leucócitos; molécula de adesão celular vascular-1 (VCAM-1), receptora para leucócitos e células vermelhas; e a molécula de adesão de célula endotelial e plaquetária (PECAM), importante para a transmigração de neutrófilos (ABELDA & BUCK 1990). As selectinas P e E são responsáveis pelo rolamento e adesão de leucócitos (GALLEY & WEBSTER 2004).

O fator desencadeante do processo inflamatório nos vasos sanguíneos de pacientes AF ainda não está claro, mas sabe-se que o endotélio sofre ativação através da adesão de células vermelhas, leucócitos e plaquetas ou pela presença de mediadores inflamatórios, tais como TNF- $\alpha$ , interleucina 1 beta (IL1- $\beta$ ), proteína C reativa e eventos de isquemia e reperfusão, que geram ROS, e podem desencadear um processo inflamatório no vaso (ASLAN *et al.*, 2001). A exposição da fosfatidilserina nas hemácias falcizadas pode ativar a cascata de coagulação e promover a inflamação, através do fator tissular (FT) e pela trombina (YASIN *et al.*, 2003). A produção do grupo heme e a diminuição da biodisponibilidade de óxido nítrico, em consequência da hemólise, provocam efeitos diretos como lesão e ativação das células endoteliais (ROTHER *et al.*, 2005, SETTY *et al.*,

2008). A ativação endotelial pode ser mediada pela ativação do fator de transcrição nuclear- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) endotelial. O NF- $\kappa$ B, quando ativado no endotélio, parece ter um papel importante na sinalização da via inflamatória que resulta na regulação exacerbada da expressão de moléculas de adesão e da produção de mediadores inflamatórios como citocinas, leucotrienos, fatores vasoconstritores, e fatores pró-coagulantes (BELCHER 2005). Assim, o endotélio ativado produz citocinas (IL-8, IL-1, IL-6) e proteína quimiotática de monócito-1 (MCP-1), (GALLEY & WEBSTER 2004).

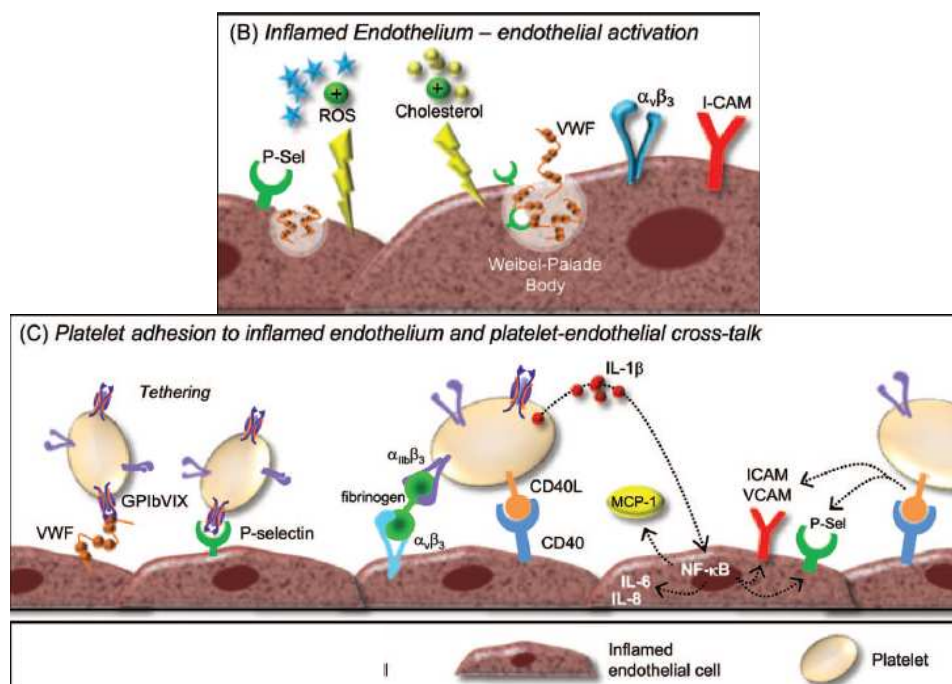
### **1.6- Plaquetas**

As plaquetas são pequenos fragmentos discóides com cerca de 2  $\mu$ m de diâmetro, anucleadas que circulam na corrente sanguínea, e originam-se a partir de protusões do citoplasma de megacariócitos, no interior da medula óssea (RUGGERI 2002). Sua principal função é manter um equilíbrio hemostático, mas também desempenham um papel importante na inflamação e imunidade. Sua membrana plasmática contém receptores formados por glicoproteínas da família das integrinas com domínios extracelulares, transmembrana e citoplasmático, que permitem a sua ativação para o meio intraplaquetário durante a agregação. As integrinas são moléculas de adesão transmembranas formadas por heterodímeros (uma cadeia  $\alpha$  e uma cadeia  $\beta$ ), que funcionam como receptores. Essas moléculas conectam-se ao meio intracelular (citoesqueleto, moléculas de sinalização, como segundos mensageiros) e ao meio extracelular através das proteínas da matriz extracelular, além disso, as plaquetas também são capazes de se conectar com outras células (HYNES 2002). Além das integrinas, existem as selectinas que são glicoproteínas transmembranas de cadeia simples que atuam no rolamento de plaquetas e leucócitos ao endotélio. As plaquetas desempenham um importante papel na patogênese dos eventos vasculares agudos, como no infarto do miocárdio e no acidente vascular cerebral (AVC). O aumento da ativação plaquetária em pacientes AF já foi relatado (WUN *et al.*, 1998 e 1999, TOMER *et al.*, 2001, VILLAGRA *et al.*, 2007, PROENÇA-FERREIRA *et al.*, 2010), e dados indicam que a circulação e a agregação das plaquetas de pacientes AF são significativamente anormais, mesmo durante os quadros de estabilidade clínica, como na ausência de crises de vaso-oclusão.

### 1.7- Adesão das plaquetas à parede vascular

O primeiro passo da adesão das plaquetas ao endotélio ocorre pela exposição e interação com macromoléculas adesivas presentes na matriz extracelular (MEC) que são expostas na superfície das células endoteliais: laminina, fibronectina, colágeno e FvW (VARGA-SZABO *et al.*, 2008), e pelas moléculas de adesão das células endoteliais (selectinas). O mecanismo de adesão das plaquetas envolve o sequestro celular no local da lesão endotelial através da interação de quatro receptores sinérgicos: a glicoproteína GPIb/IX/V (CD42b/CD42a) presente em plaquetas; a integrina  $\alpha_2\beta_1$  (glicoproteína GPIa/IIa; CD49b/CD29), ligante para o colágeno; a integrina  $\alpha_{IIb}\beta_3$  (glicoproteína GPIIb/IIIa; CD41a/CD61), ligante para o fibrinogênio e a integrina  $\alpha_5\beta_1$  (glicoproteína GPIc/IIIa; CD51/CD61), ligante para a fibronectina (RUGGERI 2002). Essa interação é amplificada pela ativação dos receptores da integrina  $\alpha_{IIb}\beta_3$  das plaquetas, e a ligação com o colágeno e estruturas subendoteliais, resultando na formação de um agregado plaquetário estável, e ligações irreversíveis com o fibrinogênio e FvW (KULKARNI *et al.*, 2000). O contato inicial entre plaquetas e células endoteliais, durante o fluxo sanguíneo, é intermediado pelas selectinas que são moléculas de adesão celular  $Ca^{+2}$ -dependentes, com domínios de reconhecimento para carboidratos (CRD), e que pertencem ao grupo das lectinas (KIERSZENBAUM 2004). A P-selectina (CD62P) é encontrada em plaquetas e células endoteliais, e quando ocorre a sua ativação em células endoteliais, ela é rapidamente expressa na sua superfície e atua como mediadora da circulação de plaquetas em arteríolas e vênulas, em processos inflamatórios (FRENETTE *et al.*, 1995 e 1998). A P-selectina é expressa na superfície das plaquetas, após a sua ativação. O ICAM-1 (molécula de adesão endotelial-1) é uma molécula de adesão endotelial importante, cuja expressão encontra-se aumentada na superfície das células endoteliais durante a ativação endotelial. A E-selectina também é expressa na superfície de células endoteliais, e quando essa molécula é ativada, ela medeia o rolamento de plaquetas e leucócitos no endotélio. As plaquetas possuem receptores na sua membrana plasmática que se ligam ao ICAM-1 através da integrina  $\alpha_{IIb}\beta_3$ , presente nas plaquetas, e o fibrinogênio (presente no plasma) é necessário para estabilizar essa ligação, permitindo assim a adesão das plaquetas ao

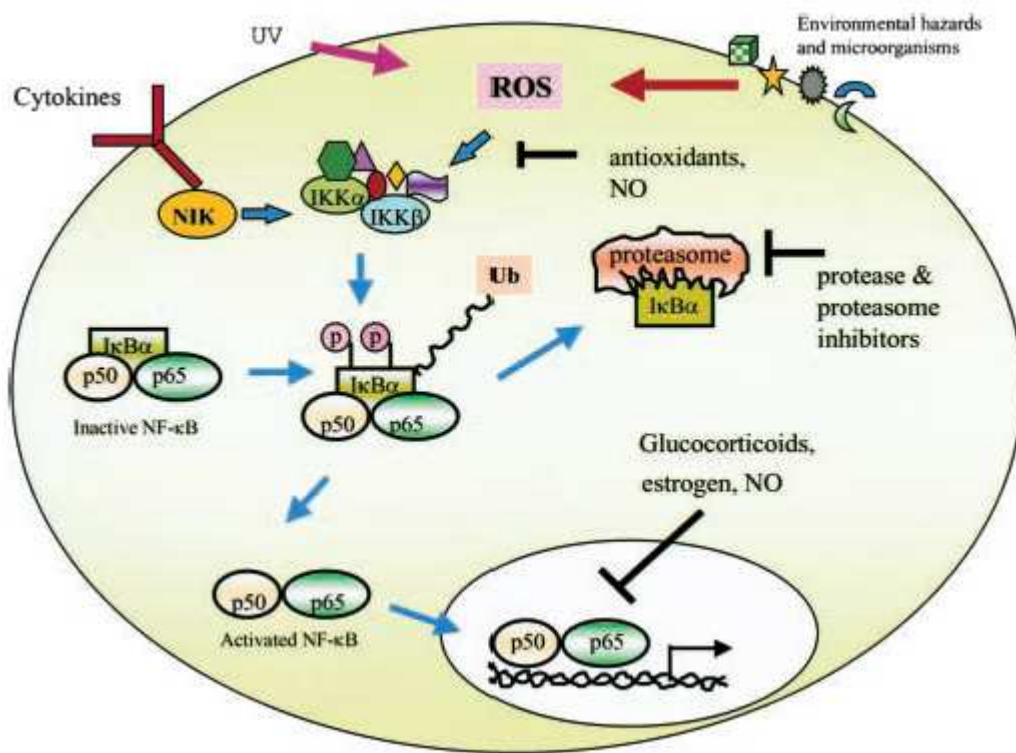
endotélio. Quando as plaquetas ativadas aderem às células endoteliais, diversas moléculas de adesão de plaquetas são ativadas, como o CD40L (ligante para o CD40; receptor da superfamília do TNF- $\alpha$ ) e P-selectina. As plaquetas podem ativar as células endoteliais via adesão ou e através da liberação de proteínas inflamatórias, como IL-1 $\beta$  e PF4 (VAN GILS *et al.*, 2009) **(FIGURA 3)**.



**FIGURA 3: Interações entre plaquetas e endotélio.** Células endoteliais inflamadas desencadeiam o mecanismo de ativação endotelial, com a liberação de ROS, a exposição do FvW e o aumento da expressão das moléculas de adesão como as selectinas P e E, da integrina  $\alpha_v\beta_3$  e ICAM-1, na superfície do endotélio (figura superior). As plaquetas são recrutadas ao local da inflamação e começam a rolar sobre a camada de células endotelial, e, consequentemente aderem aos ligantes protéicos. A adesão das plaquetas ao endotélio inflamado é mediada pela ativação da integrina  $\alpha_{IIb}\beta_3$  e CD40L presentes nas plaquetas, as quais se ligam à integrina  $\alpha_v\beta_3$  ou ICAM-1 que estão nas células endoteliais (figura inferior). As plaquetas, quando estão ativadas e aderidas ao endotélio, secretam a citocina IL-1 $\beta$ , que resulta na ativação do NF- $\kappa$ B endotelial, o qual participa da transcrição gênica e ativação de genes que codificam moléculas de adesão (ICAM-1, VCAM-1 e P e E-selectina) e citocinas inflamatórias (IL-6, IL-8 e MCP-1) presentes nas células endoteliais. (adaptado: KAPLAN ZS, JACKSON SP., *Hematology*, 2011. *Inflamed Endothelium – endothelial activation* (endotélio inflamado – ativação endotelial); P-sel (P-selectina); ROS (espécies reativas ao oxigênio); cholesterol (colesterol); vWF (fator de von Willebrand);  $\alpha_v\beta_3$  (integrina alfa V beta 3, recepto para vitronectina); Weibel-Palade body (corpos de Weibel-Palade); Platelet adhesion to inflamed endothelium and platelet-endothelial cross-talk (adesão de plaquetas ao endotélio inflamado e a comunicação entre plaquetas e células endoteliais); tethering (rolamento); fibrinogen (fibrinogênio); MCP-1 (proteína quimiotática de monócito-1); CD40L e CD40 (ligante do CD40; receptor da superfamília do TNF- $\alpha$ ); NF- $\kappa$ B (fator nuclear  $\kappa$ B); key (chave); inflamed endothelial cell (célula endotelial inflamada); platelet (plaqueta).

### 1.8- O fator de transcrição nuclear- $\kappa$ B e a ativação de células endoteliais

A ativação das células endoteliais é regulada, em parte, pela ativação do fator de transcrição nuclear- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B). O NF- $\kappa$ B é uma proteína que encontra-se inativa no citoplasma das células mas, quando é ativada, ocorre a sua translocação para o interior do núcleo, atuando assim como fator de transcrição de genes promotores (COLLINS 1993). O NF- $\kappa$ B é formado por 11 famílias de proteínas, e cada proteína é composta por duas subunidades protéicas (heterodímero). A ativação do NF- $\kappa$ B acontece quando há um sinal extracelular (vírus, bactéria, citocina, ou ROS) na membrana da célula, o qual ativa a sinalização intracelular através de proteínas quinases (IKK $\alpha$  ou IKK $\beta$ ) e que fosforilam a proteína I $\kappa$ B $\alpha$  (proteína inibidora que está acoplada ao heterodímero) presentes no citoplasma, e consequentemente as subunidades da proteína são expostas (ativadas) e translocadas para o núcleo da célula (BEG *et al.*, 1992, HENKEL *et al.*, 1992), **(FIGURA 4)**. O NF- $\kappa$ B quando ativado é capaz de regular a transcrição ou repressão de diversos genes, como genes que codificam proteínas para resposta inflamatória, para moléculas de adesão (COLLINS *et al.*, 1995), fator tissular (MACKMAN *et al.*, 1991) e citocinas (COLLINS 1993). A proteína p65 (corresponde à subunidade p65), codificada pelo gene *RelA*, é a mais importante e capaz de ativar diversas vias inflamatórias em diversos tipos celulares, principalmente em células endoteliais. A proteína p50 (corresponde à subunidade p50), codificada pelo gene *NF $\kappa$ B1A*, interage com o *RelA* e atua na regulação de uma resposta imune à infecção, mediante o aumento do estresse oxidativo e de citocinas inflamatórias, em diversos tipos celulares. Neste trabalho foram estudados os genes que codificam as subunidades p50 (*NF $\kappa$ B1A*) e p65 (*RelA*) envolvidos na ativação de células endoteliais, e as principais proteínas que participam da via de sinalização e que regulam a sua ativação, a I $\kappa$ B $\alpha$  (corresponde ao gene *CHUK*) e IKKB (corresponde ao gene *IKKB*).



**FIGURA 4: Esquema da via de ativação do fator de transcrição nuclear-κB (NF-κB).** Quando sinais extracelulares como citocinas, UV (radiação ultravioleta), vírus ou bactérias são emitidos, a proteína quinase IKKα ou IKKβ é ativada, podendo fosforilar a proteína inibitória IκBα, a qual se desprende do heterodímero (p50/p65). O heterodímero, quando liberado, torna-se ativo e é translocado para o núcleo da célula ligando-se à sítios promotores de genes: genes que codificam moléculas de adesão, citocinas e até mesmo o próprio NF-κB (CHEN F *et al.*, *Clinical Chemistry*, 1999). *Cytokines* (citocinas); *UV* (ultra violeta); *antioxidants* (antioxidantes); *proteosome* (proteossomo); *protease & proteosome inhibitors* (protease e inibidores de proteossomo); *inactive NF-κB* (fator nuclear-κB inativo); *glucocorticoids, estrogen, NO* (glucocorticóides, estrogênio e óxido nítrico); *activated NF-κB* (fator nuclear-κB ativado); *Environmental hazards and microorganisms* (riscos ambientais e microorganismos).

## ***2. JUSTIFICATIVA***



Nosso grupo de pesquisa tem investigado as propriedades adesivas de vários tipos celulares em pacientes com anemia falciforme, que incluem os leucócitos (CANALLI et al., 2004 e 2005, ASSIS et al., 2005); neutrófilos (ALMEIDA et al., 2008, CANALLI et al., 2007 e 2008, MIGUEL et al., 2011), células vermelhas (GAMBERO et al., 2007) e plaquetas (FERREIRA et al., 2008, PROENÇA-FERREIRA et al., 2010, Garrido et al., 2012). A adesão celular exerce um papel importante no processo de vaso-oclusão, que é a principal manifestação da anemia falciforme. O envolvimento de plaquetas nesse processo ainda não está claro. A nossa hipótese é que as plaquetas de pacientes com anemia falciforme participam no processo de vaso-oclusão, pois tem a capacidade de aderir a proteínas encontrados na parede vascular.



### ***3. OBJETIVOS***

---



### **3.1- Geral**

Investigar a capacidade das plaquetas de pacientes com anemia falciforme de aderirem às células endoteliais, e avaliar o efeito dessas plaquetas na ativação endotelial.

### **3.2- Específicos**

- 3.2.1-** Investigar se as plaquetas de pacientes AF induzem a expressão de moléculas de adesão na superfície endotelial.
- 3.2.2-** Avaliar a adesão de plaquetas de pacientes AF, em condições de fluxo e estáticas.
- 3.2.3-** Quantificar mediadores inflamatórios: plaquetas de pacientes AF e células endoteliais, *in vitro*.
- 3.2.4-** Analisar o efeito das plaquetas de pacientes AF na expressão de genes de ativação endotelial.
- 3.2.5-** Investigar a participação da via NF- $\kappa$ B na ativação endotelial induzida por plaquetas de pacientes AF.



## ***4. CASUÍSTICA E MÉTODOS***

---



#### **4.1- Pacientes**

Centro de Hematologia e Hemoterapia Hemocentro (UNICAMP, Campinas): Médicos responsáveis pelos pacientes prof. Dr. Fernando Ferreira Costa, prof<sup>a</sup> Dra. Sara T.O. Saad, Dra. Fabíola Traina e Dr. Kleber Fertrin.

Centro Infantil Boldrini (Campinas): Médica responsável pelos pacientes Marilene de Fátima Reis Ribeiro, e a enfermeira chefe responsável pelo programa de Doença Falciforme, Melissa Ercolin dos Santos.

Foram selecionados pacientes com AF homozigotos para a HbS (SS) e indivíduos voluntários sadios (HbAA) como controles (CON), diagnosticados através dos métodos de Eletroforese de Hemoglobina e pela Cromatografia Líquida de Alta Pressão (HPLC) (*VARIANT<sup>TM</sup>*; *Bio-Rad Laboratories*, Hercules, CA, EUA). Foram coletados aproximadamente 12 mL de sangue periférico de cada indivíduo controle e paciente (tubos contendo o anticoagulante citrato de sódio e ácido cítrico dextrose), para obtenção das plaquetas. O grupo de pacientes AF, cujas idades variam entre 18-53 anos (homens e mulheres), estava sob a terapia com HU. O grupo de controles foi composto por indivíduos voluntários que estudavam e/ou trabalhavam na UNICAMP e no centro Boldrini (19-61 anos; homens e mulheres). Os indivíduos controles e pacientes não haviam ingerido aspirina (ácido acetilsalisílico) por pelo menos 10 dias antes da data da coleta das amostras, e não receberam nenhuma gratificação financeira pela participação na pesquisa. Foram recrutados apenas os pacientes em fase estável, ou seja, ausência de crises de dores, infecções e transfusões prévias por pelo menos três meses anteriores à data da coleta das amostras. Os pacientes eleitos para a terapia com HU (15-30 mg/Kg/dia) apresentaram os seguintes critérios de uso da medicação (critérios de inclusão): crises de vaso-oclusão superiores a três vezes ao ano, e/ou repetidos episódios de síndrome torácica aguda. Todos os indivíduos (controles e pacientes) que participaram deste estudo assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP (nº 0899.0.146.000-09, data da aprovação pelo comitê 15/12/2009), e pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Centro Infantil Boldrini (nº 07/2011, data de aprovação pelo comitê 10/02/2012).

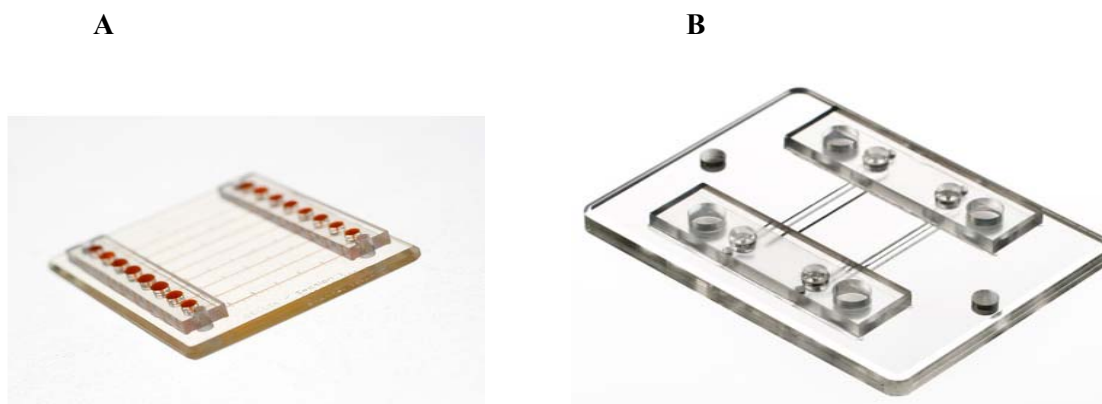
#### 4.2- Separação de plaquetas

Amostras de sangue periférico (12 mL) foram coletadas em tubos contendo o anticoagulante citrato de sódio (3,2%) com ácido cítrico-dextrose (ACD). As amostras foram centrifugadas por 20min, 200g à 21°C. O plasma rico em plaquetas (PRP) foi transferido para um tubo *falcon* (15 mL), ao qual foi adicionado um tampão de lavagem (NaCl 140 mM / KCl 0,5 mM / citrato de sódio 12 mM / glicose 10 mM / sacarose 12,5 mM, pH=6), na proporção de 5:7 (5 partes de PRP para 7 partes de tampão), e centrifugado por 12min, 800g à 21°C. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* de plaquetas (plqs) foi ressuspensionado delicadamente (para evitar ativação plaquetária) em 500 µL meio de cultura F-12K (sem soro e fatores de crescimento). O número total de plqs foi calculado no equipamento *Beckman Coulter* (Fullerton, CA, EUA).

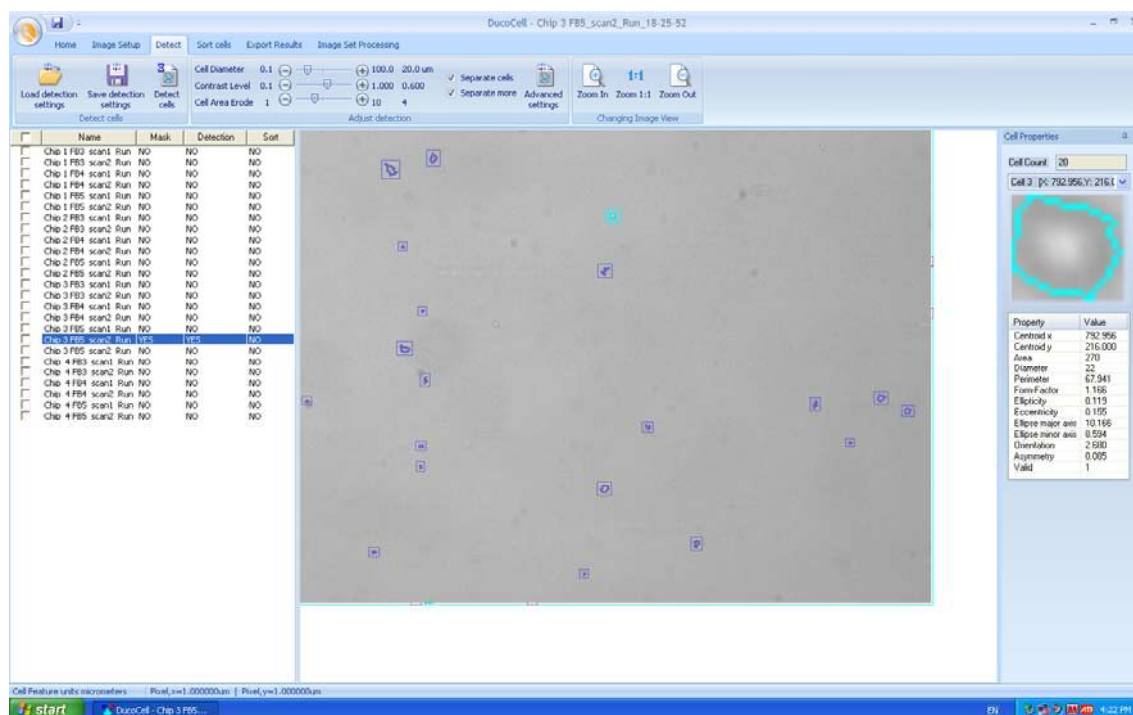
#### 4.3- Ensaio de adesão em fluxo com plaquetas – Cellix: VenaFlux™

A plataforma VenaFlux™ é um sistema semi-automatizado que permite mimetizar a circulação do sangue *in vitro*. A plataforma utiliza um sistema de biochips com microcapilares de 400 µm e 600 µm de largura que podem ser revestidos com moléculas de adesão recombinantes, proteínas da matriz extracelular ou monocamadas de células endoteliais (**FIGURA 5**). Um microscópio óptico invertido com contraste de fase e fluorescência é acoplado ao sistema, e uma nanobomba é utilizada para promover cisalhamento (*shear* estresse) de 0,01 – 20 *dynes/cm*<sup>2</sup>, que desloca suspensões celulares através dos canais. A adesão celular é visualizada através do microscópio sendo a imagem projetada no monitor. Para este estudo foram utilizados biochips de 8 canais (Vena8™; 400 µm de largura x 100 µm de profundidade) revestidos com as proteínas recombinantes humanas do fibrinogênio (FB, 50 µg/mL) e/ou colágeno tipo I (Col, 10 µg/mL), para a adesão de plaquetas de indivíduos controles (plqs CON) e pacientes AF (plqs SS). Os biochips foram preparados com 24h de antecedência ao ensaio, e 11 µL das soluções de FB e/ou Col (preparadas com tampão de Krebs) foram adicionados para o revestimento de cada canal. Subsequentemente, os biochips foram armazenados em uma câmara úmida, 4°C, *overnight*. No dia do ensaio, os sítios inespecíficos de cada canal foram bloqueados (para evitar a adesão de células aos sítios inespecíficos) com 11 µL de uma solução de Krebs com 1% de albumina de soro bovino (BSA), durante 30min, em câmara úmida e na

temperatura ambiente (TA). Após o bloqueio, os biochips foram acoplados à plataforma e os canais foram lavados uma vez com solução de Krebs, de acordo com o protocolo estabelecido pelo *VenaFlux software* (Irlanda, Dublin). Suspensões de plaquetas lavadas (como descrito anteriormente) foram utilizadas para o ensaio de adesão em fluxo, e a concentração de plqs e o cisalhamento foram previamente padronizados; concentrações de plaquetas testadas foram:  $1 \times 10^6$ ;  $5 \times 10^6$ ;  $1 \times 10^7$ ;  $5 \times 10^7$  e  $1 \times 10^8$  plqs/mL, sendo que a escolhida para a realização dos demais experimentos foi de  **$5 \times 10^6$  plqs/mL**. Com relação as diferentes forças de cisalhamentos, foram testadas:  $0,3 \text{ dynes/cm}^2$ ;  $0,5 \text{ dynes/cm}^2$ ;  $1 \text{ dynes/cm}^2$ ;  $5 \text{ dynes/cm}^2$  e  $10 \text{ dynes/cm}^2$ , sendo definido para os experimentos com as plaquetas foi de  **$0,3 \text{ dynes/cm}^2$** . O ensaio de adesão em fluxo para cada amostra de plqs durou 3min ( $37^\circ\text{C}$ ), e as imagens foram capturadas na objetiva de 40x. Para cada amostra, um único canal foi utilizado e os resultados estão expressos como a média das três imagens capturadas por cada canal. A análise dos resultados foi realizada através do software *DucoCell, Cellix* (**FIGURA 6**), com base nos seguintes parâmetros: diâmetro, área, nível de contraste e perímetro. Foram excluídos das análises hemácias, leucócitos e agregados de plaquetas. Todos os experimentos foram realizados no contraste de fase e campo claro.



**FIGURA 5: Biochips para ensaios de adesão em fluxo utilizados na Plataforma VenaFluxTM® (Cellix, Irlanda).** (A) Vena8; biochip de 8 canais de 400  $\mu\text{m}$  (diâmetro) para proteínas recombinantes; (B) VenaEC; biochip de 2 canais para células endoteliais de 600  $\mu\text{m}$  (diâmetro). Imagem do site: <http://www.cellixltd.com/index.php/products/biochips>.



**FIGURA 6: Análise da adesão de plaquetas em condições de fluxo através do software DucoCell (Cellix, Irlanda).** Adesão de plaquetas de CON ( $5 \times 10^6$  plqs/mL) ao FB ( $50 \mu\text{g/mL}$ ), durante 3 min;  $0,3 \text{ dyne/cm}^2$ ;  $37^\circ\text{C}$ ; aquisição de 3 imagens por canal. As imagens circulasdas em azul são plqs aderidas por  $0,01 \text{ mm}^2$  e a análise é baseada nos seguintes parâmetros, para cada plqs: área, perímetro e nível de contraste.

#### 4.4- Cultura de Células Endoteliais de Veia Umbilical Humana – HUVEC

As células HUVECs foram adquiridas do banco de células americano ATCC (*The Global Bioresource Center*), ATCC nº 1730-CRL (lote 59510065) e mantidas em nosso laboratório (nitrogênio líquido). As HUVEC são células do tipo aderente (aderem ao fundo da placa/garrafa e formando um “tapete”) e foram cultivadas em meio de cultura Ham’s F12-K (Invitrogen), suplementado com 10% de soro bovino fetal (FBS, *Invitrogen*);  $0,05 \text{ mg/mL}$  de fator de crescimento *Endothelial Cell Growth Supplement Bovine Neural Tissue* (ECGS, Calbiochem);  $1 \text{ mg/mL}$  de heparina líquida e 1% dos antibióticos streptomomicina ( $10000 \mu\text{g/mL}$ ) e penicilina ( $10000 \text{ U/mL}$ ). As células foram cultivadas em

garrafas de 75 cm<sup>2</sup> na proporção 1:15 de meio de cultura, previamente tratadas com uma solução de gelatina 0,1% (20min, 37°C). O excesso de gelatina foi descartado antes da adição das células. Ao atingirem a confluência desejada (aproximadamente 90%), as células foram “repicadas”, ou seja, redistribuídas em outras garrafas para aumentar a proliferação celular. As células foram retiradas das garrafas com uma solução de tampão fosfato (PBS, pH=7,2) com tripsina (0,25% w/v) e EDTA (0,53 mM), pois essa solução possui atividade proteolítica sobre as proteínas das membranas celulares. Cerca de 2 mL da solução de PBS/Tripsina/EDTA foi adicionado por garrafa (4min, 37°C, 5% CO<sub>2</sub>). Após o desprendimento total das células (visualização pelo microscópio óptico invertido), neutralizou-se a tripsina, já que esta é tóxica para as células, com a adição de 2 mL de FBS. As células em suspensão foram lavadas com PBS e centrifugadas por 7min, 130g, 30°C. O sobrenadante foi descartado, o *pellet* de células foi ressuscitado com meio de cultura suplementado com FBS e fator de crescimento, e em seguida as células foram distribuídas em novas garrafas (proporção de garrafa 1:2). A cada repique das células era contabilizada uma nova passagem das mesmas, sendo utilizadas em experimentos até a 12ª passagem.

#### **4.5- Ensaio de adesão estática de plaquetas com HUVEC**

O princípio da técnica de ensaio de adesão estática foi baseado de acordo com BELLAVITE e colaboradores (1994). No dia anterior ao ensaio, placas de 96 poços estéreis e livres de DNase e RNase (*Grenner, CellStar*) de fundo chato foram previamente tratadas com 60 µL de uma solução de gelatina 0,1% (20min, 37°C). Após a incubação, a gelatina foi descartada e as HUVECs foram cultivadas em 3 diferentes concentrações: 1x10<sup>4</sup>; 2x10<sup>4</sup> e 3x10<sup>4</sup> céls/mL (experimentos de padronização), em volume

final de 50  $\mu\text{L}$ /poço (meio suplementado como descrito anteriormente). Os demais experimentos foram realizados utilizando-se a concentração que atingiu a melhor confluência ( $3 \times 10^4$ ) de HUVEC (aproximadamente  $1,5 \times 10^2$  céls/poço). Os ensaios foram realizados na presença ou não do TNF- $\alpha$  (10 ng/mL), ou seja, as HUVEC foram pré-incubadas durante 3h, 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, com ou sem TNF- $\alpha$  e, após esse período, as plqs foram adicionadas às HUVEC (1h, 37°C e 5% CO<sub>2</sub>). A concentração de plaquetas foi previamente padronizada com amostras de indivíduos saudáveis (plqs CON), utilizando-se as seguintes concentrações:  $1 \times 10^5$ ,  $1 \times 10^6$ ,  $1 \times 10^7$ ,  $1 \times 10^8$  plqs/mL e definindo-se  **$1 \times 10^8$  plqs/mL**, proporção de aproximadamente 1:100 (célula HUVEC/plaquetas) como a melhor concentração de plqs. Os ensaios de adesão foram realizados em triplicata, onde 50  $\mu\text{L}$  da suspensão de plqs/poço era incubado por 60min (37°C, 5% CO<sub>2</sub>). Para cada indivíduo era realizado 2 tipos de controles negativos:

1º) HUVEC + meio de cultura (F-12K)

2º) HUVEC + solução de Krebs.

Após a incubação, as plaquetas não aderentes foram desprezadas, e a placa foi lavada gentilmente duas vezes com 200  $\mu\text{L}$  de solução de Krebs. Em seguida, adicionou-se 50  $\mu\text{L}$  de Krebs e 150  $\mu\text{L}$  do substrato da fosfatase ácida (0,1 M de tampão citrato; pH=5,4; 5 mM p-fosfato de nitrofenila e 0,1% de Triton X-100, *Sigma*), em cada poço, que permaneceu incubado por 1h (TA). Após a incubação, foi adicionado 100  $\mu\text{L}$  de NaOH (2 N) em cada poço para interromper a reação. A absorbância foi quantificada através do espectrofotômetro no comprimento de onda de 405 nm (*Multiscan MS, Labsystems, EUA*), e a porcentagem de plqs aderidas foi calculada a partir da comparação das

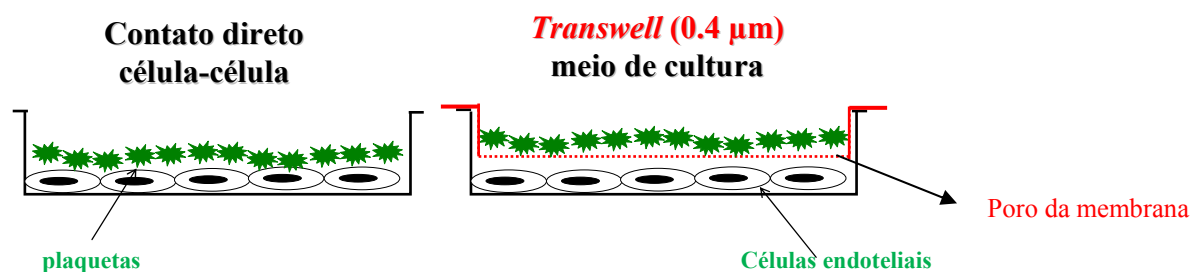
absorbâncias dos poços com uma curva padrão (uma curva para cada amostra), formada a partir da diluição da suspensão original ( $1 \times 10^8$  plqs/mL) de plaquetas.

#### **4.6- Co-cultura de HUVEC com plaquetas**

As HUVEC foram cultivadas como descrito anteriormente, e para os experimentos de co-cultura em placas de 6 poços (fundo chato) foi utilizado aproximadamente  $1 \times 10^6$  HUVEC/poço ou cerca de 90% de confluência. As placas foram preparadas com 24h de antecedência. No dia dos experimentos, não foi adicionado nenhum suplemento (fator de crescimento, heparina, ao meio de cultura (FBS, fator de crescimento, heparina ou antibióticos), para evitar resultados falsos positivos na quantificação de citocinas liberadas no sobrenadante. Os experimentos foram realizados em condições basais, e após estímulo de TNF- $\alpha$  (controle positivo; HUVEC pré-incubadas por 3h, 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, com 10 ng/mL de TNF- $\alpha$  em meio de cultura). Para a co-cultura, as plqs foram separadas como descrito anteriormente, adicionadas em uma concentração de  $1 \times 10^8$  plqs/poço e incubadas durante 4h, 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Para cada amostra de plqs CON e plqs SS, também foi realizada uma cultura apenas com plaquetas (sem HUVEC), para comparar com níveis de citocinas liberados pelas plqs. Ao final dos experimentos, os sobrenadantes (tanto da cultura como das co-culturas) foram transferidos para tubos *falcon* (15 mL) e centrifugados à 800g, 15min, TA. Todos os sobrenadante foram armazenados (-80°C), para a quantificação de citocinas através de kits de ELISA. As HUVEC foram retiradas dos poços com solução de tripsina/EDTA, como descrito anteriormente, para os estudos de citometria de fluxo, extração de RNA (expressão gênica) e/ou para obtenção de extratos nucleares (ativação do NF- $\kappa$ B).

#### 4.7- Co-cultura com insertos de transwell

Em alguns experimentos de co-cultura em placas de 6 poços, suportes de *transwell* (poro da membrana de 0,4  $\mu\text{m}$  e 30 mm de diâmetro; *Millicell*<sup>®</sup> *Millipore*) foram utilizados durante a incubação de HUVEC com plqs, para dividir o poço em dois compartimentos (superior e inferior). Desta maneira, apenas o meio de cultura era compartilhado e não haveria contato célula-célula. Esses experimentos foram realizados para os estudos de expressão de moléculas de adesão na superfície das HUVEC (ICAM-1 e E-selectina), através da técnica de citometria de fluxo. As placas foram preparadas com 24h de antecedência ( $1 \times 10^6$  céls/poço). No dia dos experimentos, não foi adicionado nenhum suplemento ao meio de cultura (FBS, fator de crescimento, heparina, antibióticos). Primeiramente, foi adicionado 1 mL/poço de meio de cultura, em seguida, um suporte de *transwell* foi introduzido no poço na posição correta, de acordo com o fabricante. No compartimento superior, foi adicionado 1,5 mL de meio com ou sem plaquetas ( $1 \times 10^8$  plqs), (**FIGURA 7**). As co-culturas foram mantidas durante 4h (37°C, 5% CO<sub>2</sub>), e ao final, os suportes de *transwells* foram retirados com o auxílio de uma pinça e descartados, e as HUVEC retiradas das placas como descrito anteriormente.



**FIGURA 7: Modelo de co-cultura de células endoteliais com plaquetas, em contato direto ou com suportes de transwell.** Experimentos realizados em placas de 6 poços (representado 1 poço por modelo), com células endoteliais aderidas ao fundo do poço, e uma suspensão de plaquetas lavadas em contato direto com as células endoteliais, ou no compartimento superior dos suportes de transwells.

#### 4.8- Citometria de fluxo: plaquetas

A expressão das moléculas de adesão na superfície das plaquetas foi determinada através da citometria de fluxo. Foram estudadas as moléculas P-selectina (anti-CD62P-FITC; clone AK6) e a integrina  $\alpha_{IIb}\beta_3$  na sua conformação de alta afinidade (PAC-1-FITC, que reconhece a integrina  $\alpha_{IIb}\beta_3$  quando ativada). Os anticorpos foram adquiridos da *Becton Dickinson, San Jose, CA, USA*. Amostras de PRP de plqs de CON e SS foram obtidas, após centrifugação 20min, 200g, 21°C, e cerca de 5  $\mu$ L do PRP (aproximadamente  $1 \times 10^8$  plqs/mL) foram fixadas com 200  $\mu$ L de solução de PBS com 1% de paraformaldeído (10min, TA). Em seguida, as plqs foram lavadas com 2 mL de PBS e centrifugadas por 15min a 800g (21°C). O sobrenadante foi descartado e os *pellets* de plqs foram ressuspensos com 45  $\mu$ L de PBS e adicionaram-se 5  $\mu$ L do anticorpo correspondente foram adicionados e incubados por 20min, protegido da luz, TA. Após a marcação com os anticorpos, as plqs foram novamente lavadas como descrito anteriormente. Ao final, o sobrenadante foi desprezado e as plqs foram ressuspensas em 300  $\mu$ L de PBS. As amostras foram analisadas a 488 nm no equipamento *FACScalibur (Becton-Dickinson, San Jose, CA, USA)*. Foram obtidos 10000 eventos para cada amostra. Histogramas de SSC/FSC (*side scatter/forward scatter*) foram utilizados para a identificação das

populações de plaquetas. A intensidade de fluorescência de cada plaqueta e a porcentagem de plaquetas positivas para o anticorpo foram comparados com plaquetas incubadas com um controle negativo de isotipo IgG<sub>1</sub>/IgG<sub>1</sub> (AbD SEROTEC, *MorphoSys* UK Ltd, *Endeavour House, Langford Business Park, Langford Lane, Kidlington, Oxford, OX5 1GE, UK*) conjugado com FITC.

#### **4.9- Citometria de fluxo: HUVEC**

A citometria de fluxo foi realizada para avaliar a expressão superficial das moléculas de adesão nas HUVEC: ICAM-1 (anti-CD54-PE, clone LB-2 - molécula de adesão intercelular 1), E-selectina (anti-CD62E-APC, clone 68-5H11) e VCAM-1 (anti-CD106-FITC, clone 5110C9 - molécula de adesão celular vascular-1). Ao final das co-culturas (4h, 37°C, 5% CO<sub>2</sub>), as HUVEC foram retiradas das placas como descrito anteriormente. As células, diluídas em PBS, foram distribuídas em tubos para citometria no volume final de 100 µL (PBS). O anticorpo (5 µL) correspondente foi adicionado em cada amostra, e os tubos foram incubados por 30min, protegidos da luz (4°C). Cada amostra possuía um tubo controle contendo apenas células, sem anticorpo. Após a incubação, as amostras foram lavadas com 1 mL de PBS e centrifugadas por 5min, 500g (T.A). As amostras foram ressuspensas em 300 µL de solução de PBS com 1% de paraformaldeído, e 10000 eventos foram obtidos para cada amostra. Histogramas de SSC/FSC foram utilizados para a identificação das populações de HUVEC.

#### **4.10- Tratamento das HUVEC com inibidores de NF-κB**

Foram utilizados 2 inibidores da via do NF-κB, o **BAY 11-7082** e o **SC-514**, em culturas de HUVEC, para avaliar a influência dessa via de sinalização na expressão superficial das moléculas de adesão analisadas, ou seja, ICAM-1 (anti-CD54-PE), VCAM-1 (anti-CD106-FITC), e E-selectina (anti-CD62E-APC) por citometria de fluxo. O BAY 11-7082 ((*E*)-3-[(4-Methylphenyl)sulfonyl]-2-propenenitrile - C<sub>10</sub>H<sub>9</sub>NO<sub>2</sub>S) é um potente agente anti-inflamatório que inibe a fosforilação da proteína IκBα, e consequentemente, inibe a ativação do fator de transcrição NF-κB. O SC-514 ((*thienothienyl*)amino-acetamide - C<sub>9</sub>H<sub>8</sub>N<sub>2</sub>OS<sub>2</sub>) também apresenta propriedades anti-inflamatórias, e inibe a proteína quinase IKKβ que indiretamente diminui a atividade do

gene do NF- $\kappa$ B. Para o BAY 11-7082, foram utilizadas as seguintes concentrações (WALDOW *et al.*, 2006, SPINELLI *et al.*, 2010) para a padronização: 0,5  $\mu$ M; 1  $\mu$ M; 5  $\mu$ M e 20  $\mu$ M. Para o SC-514 foram testadas as seguintes concentrações (SPINELLI *et al.*, 2010) para a padronização: 1  $\mu$ M; 10  $\mu$ M; 50  $\mu$ M e 100  $\mu$ M. As HUVEC também foram incubadas com DMSO como controle do veículo utilizado para solubilizar os inibidores, nas concentrações equivalentes aos inibidores (0,02% w/v). Os experimentos (placas de 6 poços) foram conduzidos com ou sem a pré-incubação de TNF- $\alpha$  (10 ng/mL; 3h, 37°C, 5% CO<sub>2</sub>) que foi utilizado como controle positivo, os inibidores foram adicionados e incubados por 30min e 60min (37°C, 5% CO<sub>2</sub>). As concentrações de **20  $\mu$ M** (BAY 11-7082) e **1  $\mu$ M** (SC-514) com **60min** de incubação foram escolhidas (dados não mostrados).

Experimentos de co-cultura, em contato direto, foram conduzidos na presença dos inibidores de NF- $\kappa$ B. As HUVEC foram cultivadas em placas de 6 poços e os inibidores (BAY 11-7082 e SC-514) foram pré-incubados por 30min (37°C, 5% CO<sub>2</sub>). Após a pré-incubação, amostras de plaquetas (CON e SS) foram adicionadas as HUVEC para a co-cultura (4h, 37°C, 5% CO<sub>2</sub>), e ao final, a citometria de fluxo foi realizada, como descrito anteriormente.

#### **4.11- Quantificação das citocinas do sobrenadante de cultura e co-cultura**

As citocinas IL-8 (interleucina 8) e IL-1 $\beta$  (interleucina 1 beta), e a quimiocina PF4 (fator plaquetário 4) foram quantificadas do sobrenadante de plaquetas isoladas, e do sobrenadante da co-culturas de HUVEC com plaquetas (4h, 37°C, 5% CO<sub>2</sub>). As citosinas foram quantificadas através de kits de ELISA (*R&D Systems*), de acordo com as instruções do fabricante.

#### **4.12- Extração de RNA e síntese de cDNA**

Ao final das incubações das co-culturas, as HUVEC foram retiradas dos poços com solução de tripsina, como descrito anteriormente. O RNA total foi extraído com o auxílio do micro kit de extração de RNA (*Qiagen*). As amostras com RNA total foram quantificadas no equipamento espectrofotômetro *NanoDrop ND-100* (*NanoDrop Technologies*) com comprimento de onda de 230 nm, e as amostras foram armazenadas a -80°C. A integridade das amostras foi verificada por eletroforese em gel denaturante de

agarose 1,2%. Amostras íntegras apresentaram duas subunidades ribossomais: 18S e 28S e foram transcritos em cDNA da seguinte maneira: as amostras de RNA obtidas foram tratadas com a enzima DNaseI para remoção de DNA contaminante, e a transcrição reversa (síntese de DNA complementar, cDNA) foi realizada a partir de 1 µg de RNA total, utilizando-se um kit de transcrição (*Fermentas Life Sciences*, EUA), de acordo com as instruções do fabricante. O cDNA foi quantificado no NanoDrop e mantido a -20°C até o momento do ensaio.

#### **4.12.1- PCR (reação em cadeia da polimerase) quantitativo em tempo real (qRT-PCR)**

Alíquotas de cDNA foram utilizadas como molde para a qRT-PCR, cuja técnica consiste no monitoramento óptico da fluorescência emitida durante a reação de PCR, através da ligação de uma sonda específica ou um corante, na fita recém sintetizada. As reações foram realizadas em duplicata, e utilizou-se o reagente *SYBRGreen PCR Master Mix®* (*Invitrogen*), que além de conter todos os reagentes necessários para a PCR (dNTPs, MgCl<sub>2</sub>, tampão, *Taq* Ampli-Gold), também possui o corante SYBRGreen, componente que intercala a dupla fita. Além do cDNA e o SYBERGreen, também utilizamos *primers* específicos para cada gene analisado. Todos os experimentos apresentavam controles negativos, onde a amostra de cDNA era substituída por água estéril. As reações foram preparadas em placas de 96 poços (*Applied Biosystems*, USA), os quais eram vedados com adesivo plástico que permite a passagem da luz. O programa foi iniciado por 10 min/95°C, seguido por 45 ciclos: 15s/95°C – 1min/60°C. A detecção de amplificação em tempo real foi realizada no equipamento *7500 Fast Real-time PCR System®* (*Applied Biosystems*, USA) e os resultados foram apresentados pelo programa *7500 Software v2.03* (*Applied Biosystems*, USA) em gráficos de fluorescência versus número de ciclos. O ciclo detecta a fluorescência acima do limite basal estabelecido (*threshold*) e é denominado ciclo de *threshold* ou Ct. Quanto maior a expressão de um gene, ou seja, quanto mais cópias existirem no início da reação, mais precocemente ocorre a amplificação e, conseqüentemente, menor é o Ct. Os níveis de expressão foram determinados através do programa *Gnorm* (VANDESOMPELE *et al.*, 2002) A expressão dos genes de interesse foi determinada de forma relativa, sendo normalizada com relação a dois genes calibradores

(*GAPDH* e *BAC*). Esses são genes endógenos cuja expressão são constitutivas, ou seja, apresentam pouca variação entre diversas condições.

#### 4.13- Extração de proteínas nucleares (extratos nucleares) de HUVEC

Para determinar a atividade intracelular do NF- $\kappa$ B, foram utilizados kits *TransAM™ NF $\kappa$ B p65/p50 (Active Motif)* que avalia a translocação do NF- $\kappa$ B até o núcleo celular. A extração das proteínas nucleares foi realizada de acordo com o protocolo do fabricante. Para a padronização, a quantidade de HUVEC foi testada em placas de 6 poços nas seguintes concentrações:  $1 \times 10^5$ ;  $2 \times 10^5$ ;  $5 \times 10^5$  e  $1 \times 10^6$  céls/poço. O melhor rendimento de proteína nuclear foi obtido a partir de  **$2 \times 10^5$  céls/poços** em duplicata, (aproximadamente  **$4 \times 10^5$  células** por amostra ou tratamento). Experimentos de co-cultura de contato direto e com suportes de *transwell*, na presença de plqs de CON ou plqs SS, foram realizados como descritos anteriormente. Ao final da incubação, os extratos nucleares foram extraídos, e a quantificação protéica foi realizada através do método de BRADFORD (1976). Os extratos nucleares foram armazenados ( $-80^\circ\text{C}$ ) até os ensaios de ELISA.

##### 4.13.1- Avaliação da atividade do NF- $\kappa$ B (subunidades p50 e p65)

A ativação das subunidades do NF- $\kappa$ B foi avaliada através dos kits de ELISA *TransAM™ NF $\kappa$ B p65/p50 (Active Motif)* de alto rendimento, a partir dos extratos nucleares previamente obtidos, como descrito anteriormente. O kit é composto por uma placa de 96 poços recobertos por um oligonucleotídeo (específico para a p50 ou p65) com sítios de ligação para o NF- $\kappa$ B, e apenas a sua forma ativa (fosforilada) ligará ao oligonucleotídeo. Um anticorpo primário detecta essa ligação, reconhecendo o epítipo (p50 ou p65) apenas quando o NF- $\kappa$ B estiver ativado e ligado ao DNA alvo. Ao final, um anticorpo secundário é conjugado levando a uma reação colorimétrica. A leitura é realizada em espectrofotômetro com comprimento de onda de 450 nm.

Primeiramente o kit foi padronizado com amostras de extratos nucleares de HUVEC tratadas ou não com TNF- $\alpha$  (10 ng/mL, 3h,  $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$ ). De acordo com o fabricante, a sensibilidade do kit é de 2 a 20  $\mu\text{g}$ /poço de extrato nuclear. Foram testadas as seguintes concentrações de extratos nucleares de HUVEC: 5, 10 e 20  $\mu\text{g}$ /poço. A melhor concentração foi de **10  $\mu\text{g}$** , de acordo com os dados seguintes na **TABELA I**:

**Tabela I: Padronização da concentração de extrato nuclear para a subunidade da p50 (NF- $\kappa$ B); kit de ELISA.**

Extrato nuclear ( $\mu$ g)	p50 (ng) de HUVEC (Basal)	p50 (ng) de HUVEC (TNF- $\alpha$ )
5	0,326	1,596
<b>10</b>	<b>0,665</b>	<b>2,239</b>
20	1,363	2,850

O estímulo de TNF- $\alpha$  foi considerado como um controle positivo para a avaliação da ativação do NF- $\kappa$ B.

#### **4.14- Análise dos resultados e estatística**

Os resultados foram expressos em medianas com valores máximo e mínimo de “n” indivíduos. Os grupos foram comparados (2 grupos) através do teste não-paramétrico não-pareado *Mann-Whitney* ou pareado *Wilcoxon*. A comparação entre 3 grupos ou mais foi realizada por ANOVA, através do teste não-paramétrico não-pareado *Kruskal Wallis*. Os gráficos e análises estatísticas foram efetuados nos programas *PRISM 5* e *GRAPHPAD INSTAT* (*GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA*), e valor de **p** menor ou igual a **0,05** foi considerado estatisticamente significativo.

## ***5. RESULTADOS***

---



### 5.1- Grupo de pacientes e controles

Foi considerado um único grupo de pacientes com AF (HbS), ao qual fizeram parte homens e mulheres com idades entre 18-53 anos. No entanto, os pacientes que estavam ou não em terapia com HU (15-30 mg/Kg/dia) foram mantidos no mesmo grupo, porque nos nossos resultados aqui apresentados, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre pacientes com ou sem HU. O grupo controle formado por indivíduos saudáveis (HbA) foi composto por homens e mulheres com idades entre 19-61 anos. Os perfis clínicos, hematológicos e demográficos dos pacientes e controles estão na **TABELA II**.

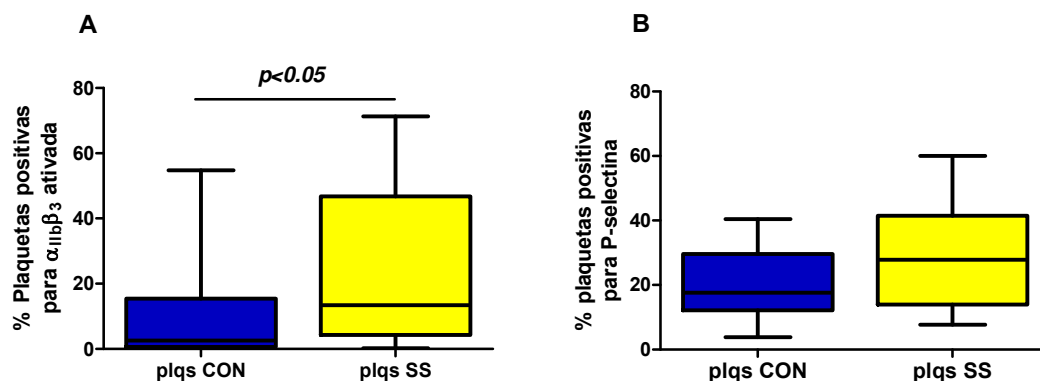
### 5.2- As plaquetas de pacientes AF circulam em estado ativado

A ativação plaquetária pode ser avaliada a partir da expressão de moléculas de adesão na superfície das plaquetas, através da técnica de citometria de fluxo. A P-selectina e a integrina  $\alpha_{IIb}\beta_3$ , ligante para o fibrinogênio, são importantes moléculas de adesão indicadoras de ativação plaquetária. Amostras de plasma rico em plaquetas (PRP) de indivíduos CON (plqs CON) e pacientes AF (plqs SS) foram marcadas com anti-CD62P (FITC), que reconhece a P-selectina, e anti-PAC-1 (FITC) que reconhece a integrina  $\alpha_{IIb}\beta_3$  na sua conformação de maior afinidade (ativada). Os resultados de citometria de fluxo mostraram que as plqs SS apresentaram um aumento estatisticamente significativo da expressão da integrina  $\alpha_{IIb}\beta_3$ , na sua conformação ativada (**FIGURA 8A**), em comparação as plqs CON. O mesmo foi observado para a P-selectina (CD62P), embora o resultado não tenha sido estatisticamente significativo (**FIGURA 8B**). Esses resultados podem indicar que as plaquetas de pacientes AF circulam em estado ativado quando comparado com as plaquetas de indivíduos saudáveis.

**Tabela II: Perfil clínico, hematológico e demográfico dos indivíduos controles (CON) e pacientes com anemia falciforme (SS) que participaram deste estudo.**

	CON	SS	P
<b>Homens/Mulheres</b>	18/37	46/44	
<b>(total)</b>	<b>(55)</b>	<b>(90)</b>	
<b>UNICAMP/BOLDRINI</b>	50/5	65/25	
<b>(total)</b>	<b>(55)</b>	<b>(90)</b>	
<b>Idade (anos)</b>	34 (31/19/61)	34 (32/18/53)	
<b>Terapia com HU (n)</b>	-	56	
<b>Hemácias (<math>10^6/\mu\text{L}</math>)</b>	4,70 (4,64/3,79/5,60)	<b>2,61</b> (2,61/1,63/4,78)	<b>p&lt;0,001</b>
<b>Hematocrito (%)</b>	39,9 (39,5/32,1/48,4)	<b>24,8</b> (22,6/17,0/37,4)	<b>p&lt;0,001</b>
<b>Hemoglobina (g/dL)</b>	13,5 (13,3/10,9/15,6)	<b>8,5</b> (8,0/6,0/12,9)	<b>p&lt;0,001</b>
<b>Volume Corpuscular Médio (fL)</b>	84,6 (84,3/74,9/95,7)	<b>96,1</b> (93,8/69,2/126,6)	<b>p&lt;0,001</b>
<b>Hemoglobina Corpuscular Média (pg)</b>	28,8 (29,0/25,2/30,8)	<b>33,4</b> (33,1/20,9/47,0)	<b>p&lt;0,01</b>
<b>Leucócitos totais (<math>10^3/\mu\text{L}</math>)</b>	6,1 (5,9/3,6/8,9)	<b>9,6</b> (9,5/4,0/22,3)	<b>p&lt;0,001</b>
<b>HbF (%)</b>	0,4 (0,3/0,1/1,7)	<b>10,6</b> (8,7/0,8/27,2)	<b>p&lt;0,001</b>
<b>Plaquetas totais (<math>10^3/\mu\text{L}</math>)</b>	293 (276/208/428)	<b>375</b> (355/156/711)	<b>p&lt;0,01</b>

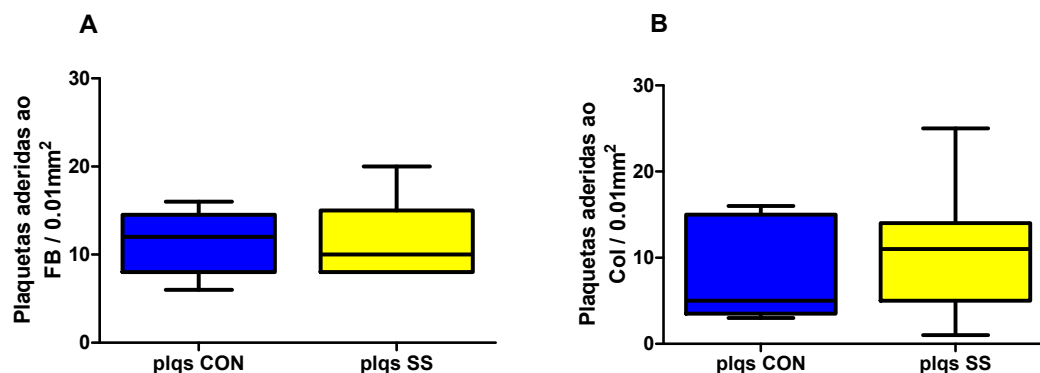
SS, pacientes sem crises; terapia com HU (15-30 mg/kg/dia  $\geq$  3 meses em terapia); HbF, hemoglobina fetal. Resultados expressos (exceto homens/mulheres) na média (valores da mediana/mínimo/máximo).



**FIGURA 8:** Expressão das moléculas de adesão  $\alpha\text{IIb}\beta_3$  ativada (anti-PAC-1) e P-selectina (anti-CD62P) na superfície das plaquetas de indivíduos saudáveis (plqs CON) e de pacientes AF (plqs SS). Amostras de plasma rico em plaquetas (PRP) foram separados de sangue periférico de indivíduos saudáveis ( $n \geq 18$ ) e pacientes AF ( $n = 32$ ), e marcados com os anticorpos PAC-1 (FITC) que reconhece a  $\alpha\text{IIb}\beta_3$  em estado ativado; e/ou CD62P (FITC), 20min, TA, e a fluorescência foi avaliada através da citometria de fluxo. (A) expressão da integrina  $\alpha\text{IIb}\beta_3$  em estado ativado,  $p < 0,05$ ; (B) expressão da P-selectina,  $p > 0,05$ ; teste Mann Whitney.

### 5.3- Avaliação da adesão de plaquetas sob condição de fluxo

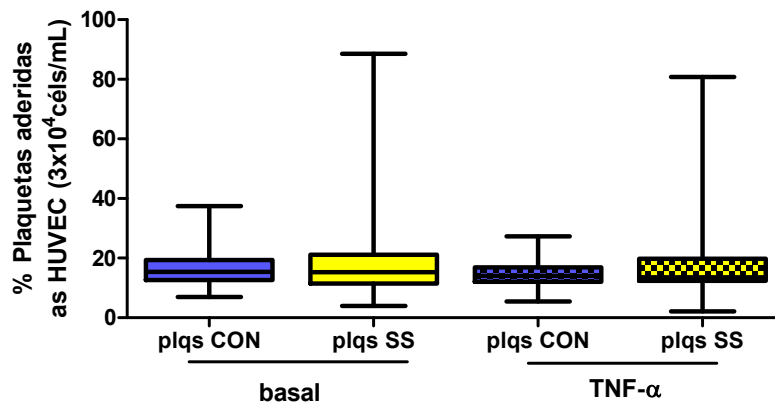
As plaquetas de pacientes com AF circulam em estado ativado, e um aumento da sua habilidade em aderir ao fibrinogênio, sob condições estáticas, já foi descrito (PROENÇA-FERREIRA *et al.*, 2010). Neste trabalho, avaliamos a adesão de plqs CON e de plqs SS por um ensaio de adesão microfluídica utilizando biochips de 8 canais (400  $\mu\text{m}$  de diâmetro) recobertos com fibrinogênio (FB; 50  $\mu\text{g/mL}$ ) e/ou colágeno (Col; 10  $\mu\text{g/mL}$ ), (Plataforma *VenaFlux*, Irlanda). Sob um fluxo de 0,3  $\text{dyne/cm}^2$ , as plqs SS apresentaram uma tendência maior em aderir ao FB que as plqs CON (**FIGURA 9A**), mas esse resultado não foi estatisticamente significativo. O mesmo foi observado para a adesão ao Col, pois as plqs SS também aderem mais em comparação as plqs CON (**FIGURA 9B**), entretanto esse aumento não foi estatisticamente significativo.



**FIGURA 9:** Adesão plaquetas de indivíduos saudáveis (plqs CON) e pacientes com AF (plqs SS) avaliado por ensaio de adesão microfluídica. Fluxo de 0,3 dyne/cm<sup>2</sup>; 3min, 37°C; canais de 400 µm. (A) Adesão ao FB (50 µg/mL) e (B) adesão ao Col (10 µg/mL); plqs CON (n=5) e plqs SS (n=11); 5x10<sup>6</sup> plqs/mL; teste Mann-Whitney (p>0,05).

#### 5.4- Adesão de plaquetas de pacientes AF a uma monocamada de células endoteliais de veia umbilical humana (HUVEC), em condições estáticas, na presença ou não de TNF-α

Foram realizados experimentos de adesão estática com plqs CON e plqs SS (1x10<sup>8</sup> plqs/mL) sobre uma monocamada de HUVEC (3x10<sup>4</sup> céls/mL), em placas de 96 poços, durante 1h, (37°C, 5% CO<sub>2</sub>). As plqs SS apresentaram uma tendência maior na adesão, entretanto esse aumento não foi significativo (**FIGURA 10**). A pré-incubação da monocamada endotelial com TNF-α (10 ng/mL, 3h, 37°C, 5% CO<sub>2</sub>), aparentemente não alterou a adesão de plqs CON e plqs SS (**FIGURA 10**). A capacidade de adesão das plqs SS à monocamada apresentou grande variação, que contribuiu para a inexistência de diferença significativa em relação as plqs CON. Entretanto, tanto o ensaio em fluxo como o estático exibiu uma tendência maior na adesão das plqs SS às HUVEC, corroborando aos resultados prévios, onde observamos um aumento significativo na adesão das plqs SS ao FB e ao Col sob condições estáticas (PROENÇA-FERREIRA *et al.*, 2010). Possivelmente um maior “n” experimental confirmaria os dados, e indicaria que as plaquetas SS apresentam as propriedades adesivas alteradas.

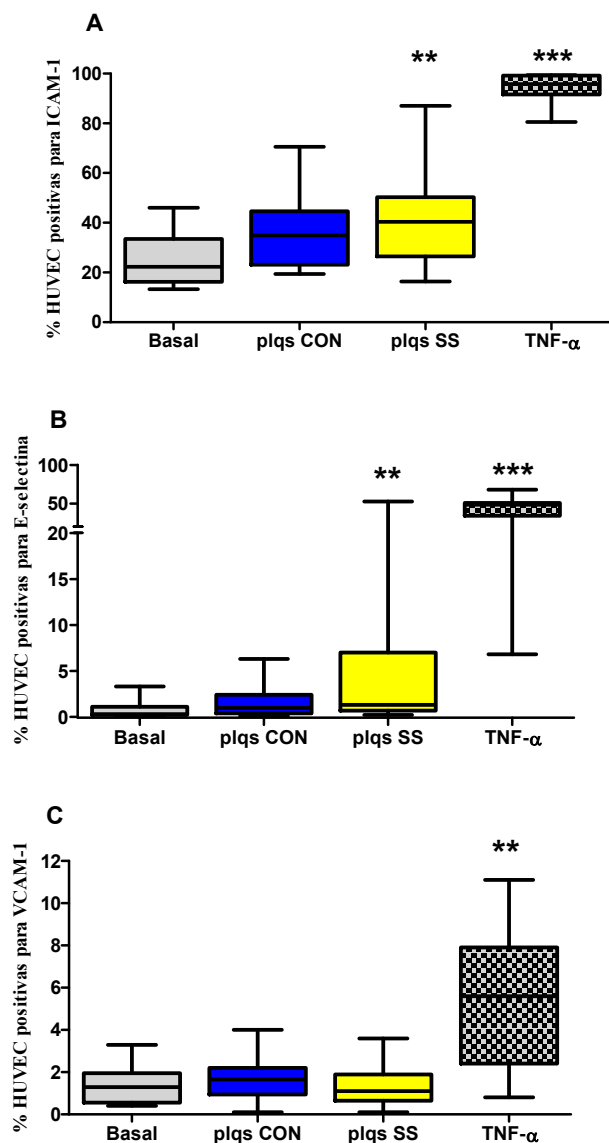


**FIGURA 10: Adesão de plaquetas de indivíduos controles (plqs CON) e de pacientes com AF (plqs SS) em monocamadas de células endoteliais (HUVEC), sob condições estáticas.** Monocamadas de HUVEC ( $3 \times 10^4$  céls/mL) foram cultivadas em placas de 96 poços, pré-estimuladas ou não com TNF- $\alpha$  (10 ng/mL; 3h, 37°C, 5% CO<sub>2</sub>). Subsequentemente, plqs CON (n=14) e plqs SS (n=24) na concentração de  $1 \times 10^8$  plqs/mL foram adicionadas aos poços com a monocamada e incubadas por 1h, 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. A adesão foi calculada em porcentagem (%) de plqs aderidas. Testes não-paramétrico *Mann-Whitney* (não pareado;  $p > 0,05$ ) e *Wilcoxon* (pareado;  $p > 0,05$ )

### 5.5- A co-incubação de células endoteliais com plaquetas de pacientes AF aumenta a expressão das moléculas de adesão ICAM-1 e E-selectina na superfície endotelial

As expressões das moléculas de adesão ICAM-1, E-selectina e VCAM-1, na superfície das HUVEC, foram avaliadas por citometria de fluxo. Foram realizados experimentos de co-cultura com HUVEC em placas de 6 poços, na presença ou não de plqs CON e plqs SS durante 4h (37°C, 5% CO<sub>2</sub>). Ao final da co-cultura, as plaquetas foram desprezadas e os anticorpos anti-CD54-PE (ICAM-1), anti-CD62E-APC (E-selectina) e anti-CD106-FITC (VCAM-1) foram utilizados para verificar a expressão dessas moléculas de adesão na superfície das células HUVEC, por citometria de fluxo. Na presença de plqs CON, a expressão de ICAM-1 (**FIGURA 11A**) e E-selectina (**FIGURA 11B**) não apresentou diferenças significativas, quando comparado à expressão basal e na presença de plqs SS ( $p > 0,05$ ). Entretanto, a co-cultura de plqs SS com HUVEC aumentou significativamente a expressão de ICAM-1 e E-selectina nas células endoteliais, quando

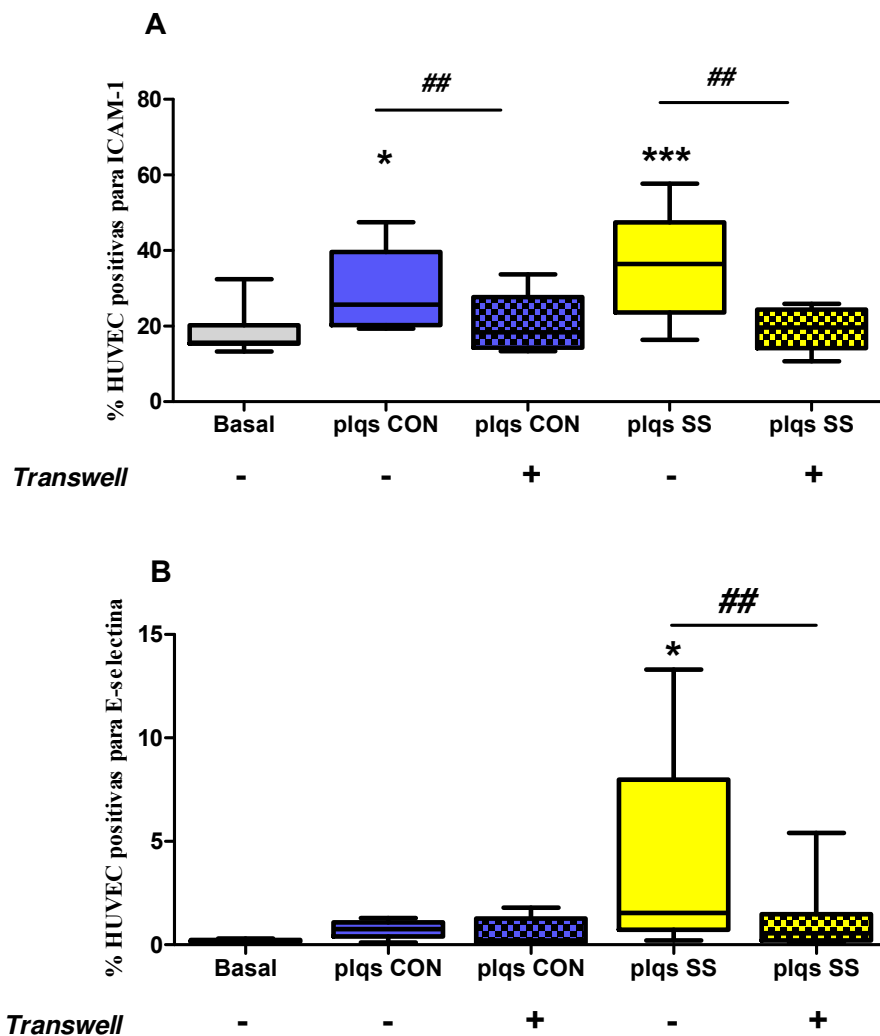
comparado à expressão basal (**FIGURAS 11A e 11B**). A pré-incubação das HUVEC com TNF- $\alpha$  (10 ng/mL, 3h, 37°C, 5% CO<sub>2</sub>) foi utilizada como controle positivo de estímulo inflamatório, aumentando significativamente as expressões de ICAM-1, E-selectina e VCAM-1 em relação às expressões basais após este estímulo (**FIGURAS 11A, 11B e 11C**). Apenas a molécula VCAM-1 não sofreu alteração na sua expressão quando as HUVEC foram co-incubadas com plqs CON ou plqs SS (**FIGURA 11C**).



**FIGURA 11: Expressão das moléculas de adesão ICAM-1 (A), E-selectina (B) e VCAM-1 (C) na superfície das HUVEC, após à co-cultura com plaquetas de indivíduos controles (plqs CON) ou pacientes AF (plqs SS). Co-cultura de HUVEC ( $1 \times 10^6$  céls/poço) com plqs CON (n=17) ou plqs SS (n=32);  $1 \times 10^8$  plqs/poço; 4h, 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Pré-incubação das HUVEC com TNF- $\alpha$  (10 ng/mL; 3h, 37°C, 5% CO<sub>2</sub>; n=15). Expressões de ICAM-1 (anti-CD54-PE), E-selectina (anti-CD62E-APC) e VCAM-1 (anti-CD106-FITC), na superfície das HUVEC, foram avaliadas por citometria de fluxo. \*\*p<0,01 e \*\*\*p<0,001 comparados às expressões basais (n=16). Teste ANOVA (p<0,0001); não pareado e não paramétrico *Kruskal-Wallis*.**

### **5.6- O aumento da expressão das moléculas de adesão ICAM-1 e E-selectina, in vitro, ocorre através do contato direto entre plaquetas de pacientes AF e células endoteliais**

Para determinar se o contato direto (físico) entre plaquetas e células endoteliais é necessário para induzir a expressão de ICAM-1 e E-selectina nas células endoteliais, os experimentos de co-cultura foram repetidos na presença de suportes de *transwell* (tamanho de poro da membrana: 0,4  $\mu\text{m}$ ), que separou fisicamente as plaquetas das HUVEC. Apenas o meio de cultura foi compartilhado entre as células. Postulamos que a ativação das células endoteliais estaria acontecendo como consequência da produção e liberação de proteínas inflamatórias pelas plaquetas. Desta forma, os resultados mostraram que após 4h de co-cultura e a co-incubação com plqs SS, a utilização dos *transwells* reduziu significativamente as expressões de ICAM-1 (**FIGURA 12A**) e E-selectina (**FIGURA 12B**) em HUVEC. A co-incubação das células endoteliais com as plqs CON, que previamente havia induzido um aumento na expressão de ICAM-1, apresentou-se reduzida na presença dos *transwells* (**FIGURA 12A**).

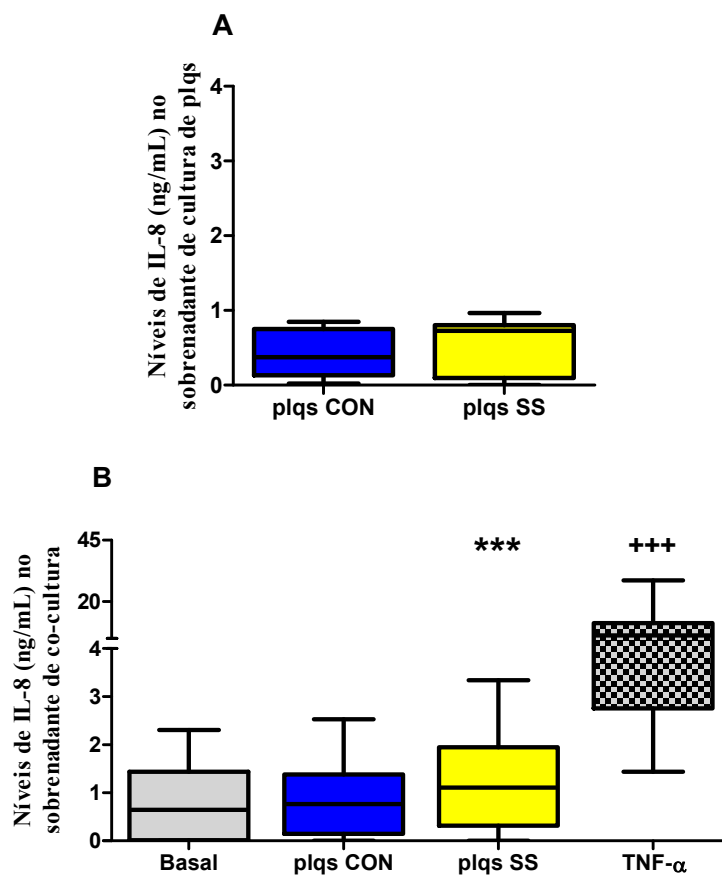


**FIGURA 12:** Expressão das moléculas de adesão ICAM-1 e E-selectina na superfície das HUVEC, após à co-cultura com plaquetas na presença e ausência de suportes de *transwell*. Co-cultura de HUVEC ( $1 \times 10^6$  céls/poço) com plqs CON (n=9) e plqs SS (n=15);  $1 \times 10^8$  plqs/poço (4h, 37°C, 5% CO<sub>2</sub>), com e sem suportes de *transwell* (0,4 µm). As expressões de ICAM-1 (anti-CD54-PE) e E-selectina (anti-CD62E-APC) nas HUVEC foram avaliadas por citometria de fluxo. (A) Expressão de ICAM-1, \*p<0,05 e \*\*\*p<0,001 comparados à expressão basal; ##p<0,01 comparados ao sem *transwell*. (B) Expressão de E-selectina; \*p<0,05 comparado à expressa basal; ##p<0,01 comparado ao sem *transwell*. Testes não paramétricos *Wilcoxon* (pareado) e ANOVA (p<0,001), *Kruskal-Wallis* (não pareado).

### **5.7- As plaquetas de indivíduos AF induzem um aumento na produção de IL-8 por células endoteliais**

A interleucina 8 (IL-8) é uma citocina inflamatória com propriedades quimiotáticas nos neutrófilos. Ela é secretada por diversos tipos celulares, como monócitos, neutrófilos, fibroblastos, células endoteliais e as próprias plaquetas. Em experimentos de co-culturas realizados em placas de 6 poços, uma monocamada de HUVEC foi co-incubada ou não com plqs CON e plqs SS (contato direto; 4h, 37°C, 5% CO<sub>2</sub>). Como controle positivo de estímulo inflamatório, alguns poços contendo HUVEC foram pré-incubados com TNF- $\alpha$  (10 ng/mL; 3h, 37°C, 5% CO<sub>2</sub>). Além das co-culturas, também foram realizadas culturas de plaquetas sem HUVEC (4h, 37°C, 5% CO<sub>2</sub>) para quantificar os níveis de IL-8 liberados do sobrenadante somente de origem plaquetária, para comparar os resultados entre plqs CON e plqs SS. Ao final das incubações, os sobrenadantes foram armazenados (-80°C), e posteriormente os níveis de IL-8 foram quantificados das amostras através de kits de ELISA.

As plaquetas liberam níveis basais de IL-8, e os resultados mostraram que no sobrenadante de cultura de plqs SS, a quantidade de IL-8 foi discretamente maior em relação as plqs CON (**FIGURA 13A**), no entanto, esse resultado não foi estatisticamente significativo. As HUVEC também liberam níveis basais de IL-8, mas em condições de co-cultura com plqs SS, houve um aumento estatisticamente significativo de IL-8 no sobrenadante (**FIGURA 13B**), em relação aos níveis basais. O mesmo não foi observado após à co-cultura das HUVEC com plqs CON. Sob o estímulo de TNF- $\alpha$ , as HUVEC liberaram altos níveis de IL-8 em comparação à todos os grupos (**FIGURA 13B**). Os nossos resultados mostraram que a interação entre plqs SS e HUVEC induziu um aumento na produção e liberação de IL-8 pelas HUVEC, pois a cultura de plqs SS (sem HUVEC) liberou níveis significativamente menores de IL-8 em relação às co-culturas. Portanto, acreditamos que a citocina IL-8 quantificada do sobrenadante das co-culturas foi liberada, provavelmente, pelas células endoteliais (HUVEC) ativadas, e não pelas plaquetas.



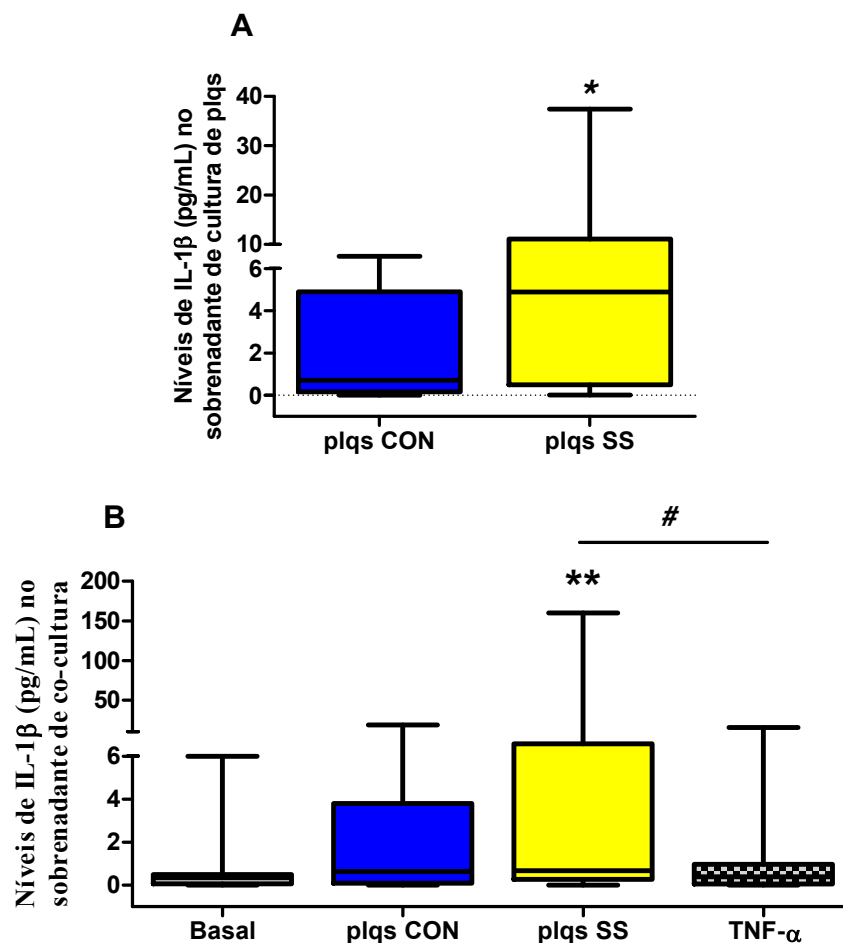
**FIGURA 13: Níveis de IL-8 do sobrenadante de cultura de plaquetas e do sobrenadante de co-cultura de HUVEC com plaquetas.** (A) Níveis de IL-8 (ng/mL) quantificados do sobrenadante de plaquetas ( $1 \times 10^8$  plqs/poço); plqs CON (n=13) e plqs SS (n=22) por ELISA, após 4h, 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. HUVEC também foram pré-estimuladas com TNF- $\alpha$  (10 ng/mL; 3h, 37°C, 5% CO<sub>2</sub>), (p>0,05). (B) Níveis de IL-8 (ng/mL) do sobrenadante de co-culturas de HUVEC ( $1 \times 10^6$  cél/poço) com plaquetas ( $1 \times 10^8$  plqs/poço), \*\*\*p<0,001 comparado aos níveis basais (n=24); +++p<0,001 comparado com todos os grupos (n=24); plqs CON (n=26) e plqs SS (n=44). Testes não-paramétricos *Mann-Whitney* (não pareado) e ANOVA (p<0,001) *Kruskal-Wallis* (não pareado).

### 5.8- Células endoteliais induzem um aumento na produção de IL-1 $\beta$ pelas plaquetas de pacientes AF

A interleucina 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) é uma importante citocina inflamatória secretada por diversos tipos celulares como monócitos, macrófagos, células NK (células *Natural Killer*), plaquetas, fibroblastos e células endoteliais. Avaliamos a capacidade das plqs CON e plqs SS secretarem IL-1 $\beta$ , após serem cultivadas por 4h, o sobrenadante da cultura foi coletado e os níveis de IL-1 $\beta$  secretados foram quantificados por ELISA. Os dados mostraram que tanto as plqs CON quanto plqs SS liberam IL-1 $\beta$ , em quantidades relativamente altas. Entretanto, os níveis de IL-1 $\beta$  liberados pelas plqs SS são significativamente maiores quando comparados às plqs CON (**FIGURA 14A**).

Em experimentos de co-culturas, como descritos anteriormente, as HUVEC foram co-incubada com plqs CON ou plqs SS (4h, 37°C, 5% CO<sub>2</sub>). Sob condições basais, as HUVEC secretam pouca IL-1 $\beta$ , e mesmo sob estímulo com TNF- $\alpha$  (10 ng/mL; pré-incubação 3h, 37°C, 5% CO<sub>2</sub>) a secreção foi baixa (**FIGURA 14B**). Quando as HUVEC foram co-incubadas com plqs SS, os níveis de IL-1 $\beta$  no sobrenadante foram significativamente maiores em comparação aos níveis basais de culturas de HUVEC, e sob estímulo de TNF- $\alpha$  (**FIGURA 14B**). Entretanto, o nível de IL-1 $\beta$  na presença de plqs CON foi alto, mas não houve diferença significativa em comparação as co-culturas com plqs SS, e aos níveis basais secretado pelas HUVEC (sem plaquetas).

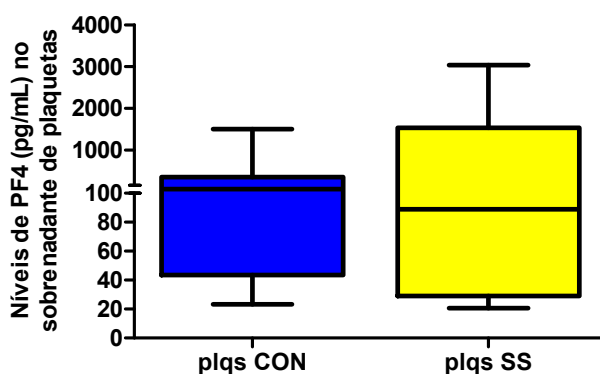
Quando comparamos os níveis de IL-1 $\beta$  do sobrenadante de plqs SS e do sobrenadante de co-culturas (quantidade equivalente de plaquetas), observamos que a liberação de IL-1 $\beta$  (provavelmente proveniente das plaquetas) é maior, indicando que o contato direto entre HUVEC e plqs SS aumenta a liberação de IL-1 $\beta$ . Sugerimos que em condições de co-cultura (*in vitro*), as plqs SS liberam ainda mais a citocina IL-1 $\beta$ . Os resultados mostraram que essa citocina inflamatória encontra-se em altos níveis no sobrenadante de cultura de plaquetas de pacientes com anemia falciforme, portanto, essas plaquetas aparentemente apresentam propriedades inflamatórias.



**FIGURA 14: Níveis de IL-1 $\beta$  do sobrenadante de cultura de plaquetas e do sobrenadante de co-culturas de HUVEC com plaquetas. (A)** Níveis de IL-1 $\beta$  (pg/mL) do sobrenadante de plaquetas ( $1 \times 10^8$  plqs/poço) e determinado por ELISA, após 4h, 37°C, 5% CO<sub>2</sub>; HUVEC também foram pré-estimuladas com TNF- $\alpha$  (10 ng/mL; 3h, 37°C, 5% CO<sub>2</sub>); plqs CON (n=16) e plqs SS (n=29). **(B)** Níveis de IL-1 $\beta$  (pg/mL) quantificados do sobrenadante de co-culturas de HUVEC ( $1 \times 10^6$  cél/poço) com plaquetas ( $1 \times 10^8$  plqs/poço); \*\*p<0,01 comparado aos níveis basais (n=24); #p<0,05 comparado ao TNF- $\alpha$  (n=24); plqs CON (n=25) e plqs SS (n=43). Testes não-paramétricos *Mann-Whitney* (não pareado) e ANOVA (p=0,02) *Kruskal-Wallis* (não pareado).

### 5.9- As plaquetas de pacientes AF liberam o fator plaquetário 4 (PF4), in vitro

O PF4 é uma importante quimiocina armazenada nos alfa grânulos, e é liberado durante a agregação plaquetária. A produção de PF4 por plqs CON e plqs SS foi avaliada por ELISA no sobrenadante das plaquetas cultivadas por 4h (37°C, 5% CO<sub>2</sub>). No sobrenadante de cultura com plqs SS, os níveis de PF4 foram maiores em comparação as plqs CON, no entanto esse resultado não foi estatisticamente significativo (**FIGURA 15**). O PF4 secretado pelas plqs SS no sobrenadante poderia contribuir para a ativação endotelial, pois o mesmo pode ficar depositado na superfície endotelial, e consequentemente pode ativar moléculas de adesão na superfície dessas células (YU *et al.*, 2005).



**FIGURA 15: Níveis de PF4 do sobrenadante de plaquetas incubadas por 4h.** Níveis de PF4 (pg/mL) do sobrenadante de culturas de plaquetas lavadas (placas de 6 poços;  $1 \times 10^8$  plqs/poços) quantificados por ELISA, após 4h, 37°C, 5% CO<sub>2</sub>; plqs CON (n=8) e plqs SS (n=22). Teste não paramétrico *Mann-Whitney* (não pareado  $p > 0,9$ ).

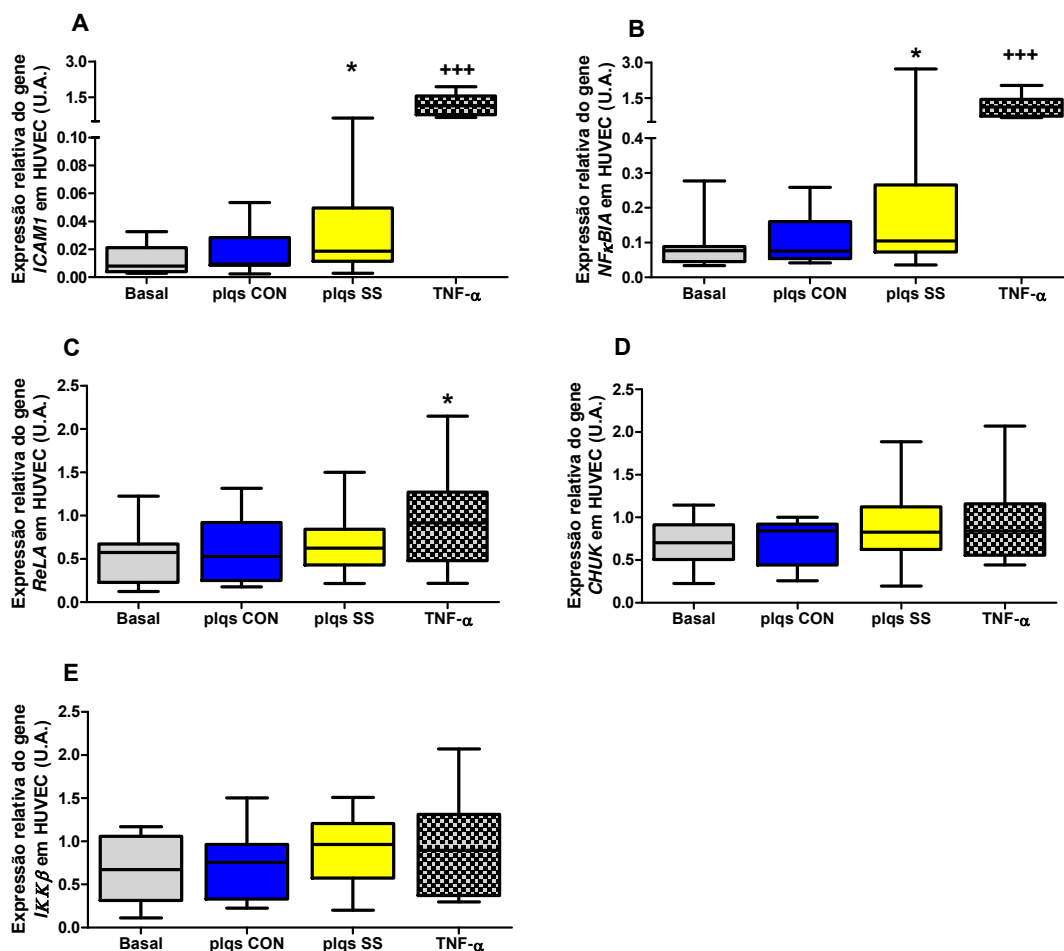
### 5.10- O efeito das plaquetas de pacientes AF na expressão de genes associados à ativação endotelial

O estudo da expressão de genes associados à ativação endotelial, pela técnica de *real time* PCR (RT-qPCR), foi realizado para investigar se as plqs SS induzem a expressão do gene (*ICAM1*) que codifica a molécula de adesão intercelular-1, e dos genes que participam da via de ativação do fator de transcrição nuclear- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B); o *NF $\kappa$ B1A* (que codifica a subunidade p50), *RelA* (que codifica a subunidade p65), *CHUK* (que codifica a proteína inibitória I $\kappa$ B $\alpha$ ) e *IKK $\beta$*  (que codifica a proteína quinase IKKB). Experimentos de

co-cultura foram realizados com HUVEC na presença de plqs CON ou plqs SS, durante 4h (37°C, 5% CO<sub>2</sub>). Como controle positivo de expressão gênica, as HUVEC foram pré-incubadas com TNF- $\alpha$  (10 ng/mL; 3h, 37°C, 5% CO<sub>2</sub>). Após as incubações, as plaquetas foram descartadas e as HUVEC foram retiradas das placas com solução de tripsina/EDTA para a extração do RNA.

Os resultados mostraram que a expressão do gene *ICAM1* nas HUVEC aumentou significativamente após co-cultura com as plqs SS, quando comparado à expressão basal (**FIGURA 16A**), entretanto, as plqs CON não tiveram nenhum efeito significativo na expressão do gene *ICAM1* em HUVEC. Sob o estímulo inflamatório do TNF- $\alpha$ , a expressão do gene foi significativamente maior em comparação à todos os grupos (**FIGURA 16A**).

O NF- $\kappa$ B é um fator de transcrição nuclear envolvido na ativação de vários genes, relacionados à ativação endotelial como moléculas de adesão ou citocinas inflamatórias. A proteína do NF- $\kappa$ B encontra-se no citoplasma da célula (forma inativa), e quando está ativado, ele é translocado para o núcleo da célula (DNA) e atua como um fator de transcrição gênica. A expressão do *NF $\kappa$ B1A* (p50) aumentou significativamente nas HUVEC quando essas células foram co-incubadas com plqs SS, comparado a sua expressão basal (**FIGURA 16B**), mas não houve diferença estatística de expressão na presença de plqs CON. O TNF- $\alpha$  (controle positivo de ativação) aumentou significativamente a expressão de *NF $\kappa$ B1A* quando comparado à todos os grupos (**FIGURA 16B**). O gene *RelA* (p65) não apresentou diferenças de expressão nas HUVEC, após co-cultura com plqs SS ou plqs CON (**FIGURA 16C**). No entanto, o TNF- $\alpha$  aumentou a expressão do gene quando comparado à expressão basal. O gene *CHUK* (I $\kappa$ B $\alpha$ ), que participa da via do NF- $\kappa$ B inibindo-o, não apresentou diferença na sua expressão em HUVEC, tanto em co-cultura com plqs SS ou plqs CON, quando sob o estímulo do TNF- $\alpha$  (**FIGURA 16D**). O gene *IKK $\beta$*  (KKB), envolvido na via de ativação do NF- $\kappa$ B, não apresentou diferença na expressão e os resultados foram semelhantes ao gene *CHUK* (**FIGURA 16E**). Interações entre plaquetas de pacientes AF e células endoteliais, contribuem para a ativação de genes de ativação endotelial (*ICAM1*) e da via do NF- $\kappa$ B (*NF $\kappa$ B1A*), pois os dados apresentados sugerem a importância e a participação das plaquetas na ativação endotelial pela via NF- $\kappa$ B.

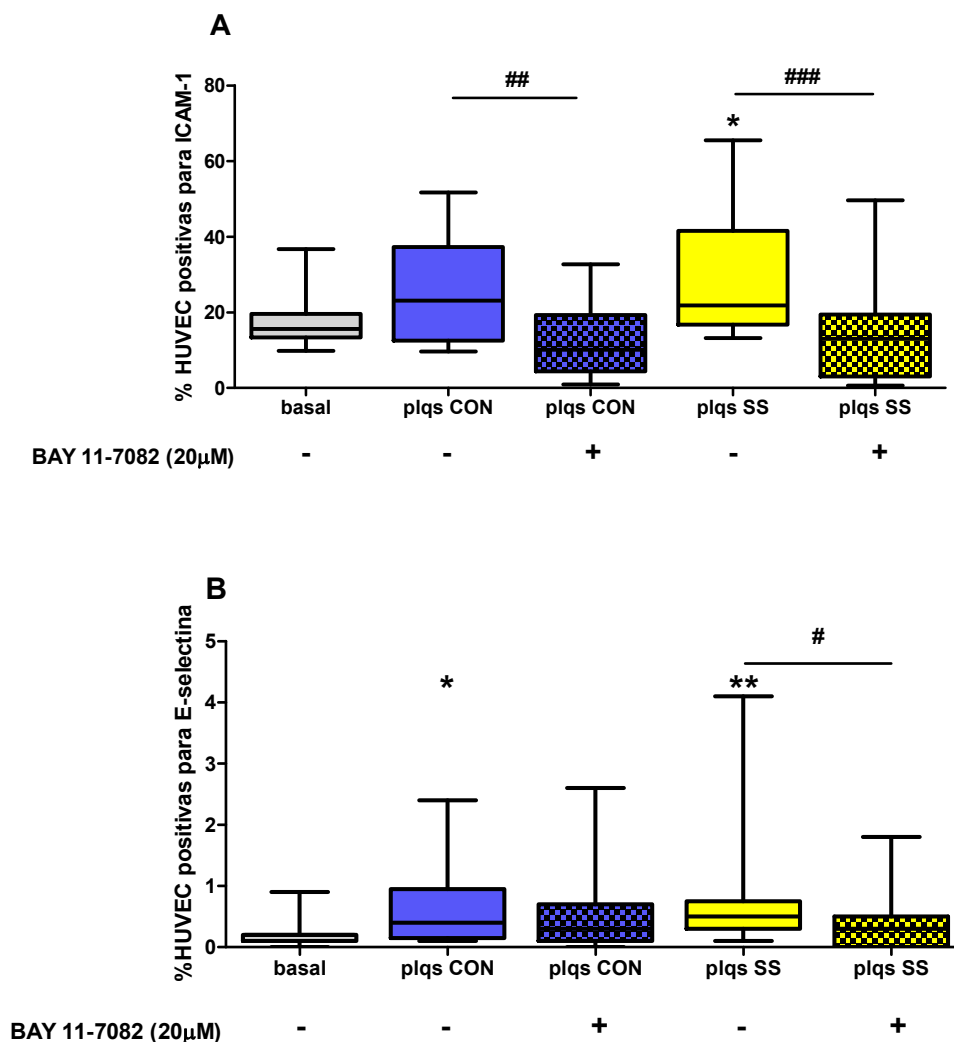


**FIGURA 16:** Expressão relativa dos genes *ICAM1* (A), *NFkBIA* (B), *ReLA* (C), *CHUK* (D) e *IKKβ* (E) em HUVEC, após à co-cultura com plaquetas. HUVEC ( $1 \times 10^6$  céls/poço) foram co-incubadas ou não com plaquetas lavadas ( $1 \times 10^8$  plqs/poço); plqs CON (n=10) e plqs SS (n=25) 4h, 37°C, 5%  $CO_2$ . HUVEC também foram pré-estimuladas com  $TNF-\alpha$  (10 ng/mL, 3h, 37°C, 5%  $CO_2$ ). Expressão gênica (U.A.) avaliada por qRT-PCR em relação a expressão dos genes endógenos calibradores *GAPDH* e *BAC*; \*p<0,05 comparada à expressão basal (n=12); +++p<0,001 comparado à todos os grupos (n=12). Teste não paramétrico ANOVA (p<0,0001), *Kruskal-Wallis* (não pareado).

### **5.11- Participação da via NF- $\kappa$ B na ativação de células endoteliais por plaquetas de pacientes AF**

Para determinar se há participação da via NF- $\kappa$ B na ativação de moléculas de adesão na superfície das células endoteliais, induzido por plaquetas de pacientes AF, acrescentamos nas culturas inibidores da via NF- $\kappa$ B, e observamos a expressão das moléculas de ICAM-1 (CD54) e E-selectina (CD62E) por citometria de fluxo. O BAY 11-7082 (20  $\mu$ M) inibe de maneira seletiva e irreversível a fosforilação da proteína I $\kappa$ B $\alpha$  (proteína inibitória do NF- $\kappa$ B), e o SC-514 (1  $\mu$ M) inibe de maneira não seletiva e reversível a proteína quinase IKKB (fosforila a I $\kappa$ B $\alpha$ ). As HUVEC foram pré-incubadas por 30min (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) com os inibidores, de acordo com a padronização descrita nos métodos. Após a pré-incubação com o BAY 11-7082 ou SC-514, as plqs CON ou plqs SS foram mantidas em co-cultura (4h, 37°C, 5% CO<sub>2</sub>) com as HUVEC, e a expressão de moléculas de adesão em HUVEC foi avaliada por citometria de fluxo.

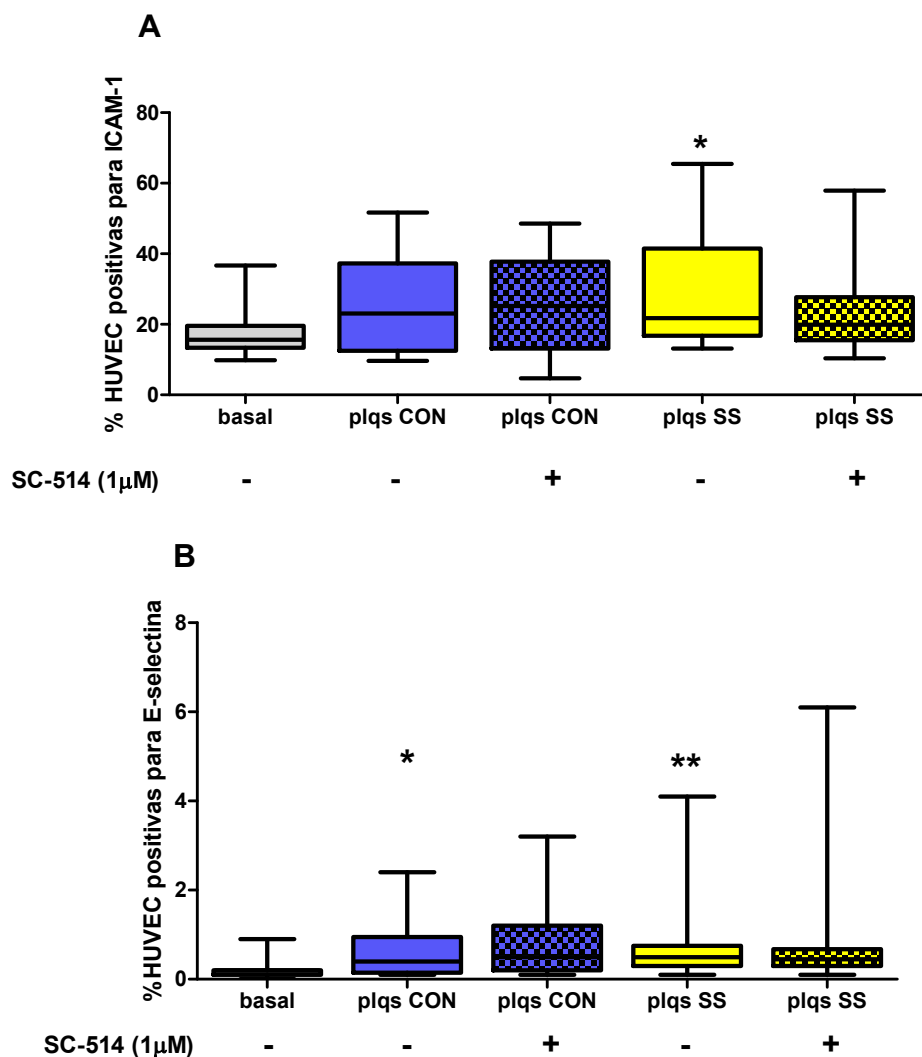
Resultados prévios mostraram que na presença de plqs SS há um aumento significativo na expressão de ICAM-1 (**FIGURA 17A**) e da E-selectina (**FIGURA 17B**) na superfície das HUVEC, em relação à expressão basal. No entanto, na presença do inibidor BAY 11-7082, a expressão de ICAM-1 e da E-selectina foi significativamente reduzida em relação às co-culturas de HUVEC sem o inibidor (**FIGURAS 17A e 17B**). Observou-se também, uma diminuição significativa na expressão de ICAM-1 em HUVEC tratadas com BAY 11-7082 em co-cultura com plqs CON (**FIGURA 17A**). A expressão de E-selectina aumentou significativamente na presença de plqs CON em relação à expressão basal, de uma forma menor do que foi observado com as plqs SS (**FIGURA 17B**).



**FIGURA 17: O efeito do inibidor da via NF-κB, BAY 11-7182, na expressão das moléculas de adesão ICAM-1 (A) e E-selectina (B), em co-culturas de HUVEC com plaquetas.** HUVEC foram pré-incubadas com BAY 11-7082 (20 μM), durante 30min (37°C, 5% CO<sub>2</sub>), e em seguida, incubadas na presença ou não de plqs CON (n=20) ou plqs SS (n=22) por 4h (37°C, 5% CO<sub>2</sub>). (A) Expressão de ICAM-1 (anti-CD54-PE) e de (B) E-selectina (anti-CD62E-APC) avaliadas por citometria de fluxo; \*p<0,05 e \*\*p<0,01 comparado à expressão basal (n=22); #p<0,05 e ###p<0,01 comparados à expressão sem o uso do inibidor. Testes não paramétricos ANOVA (p<0,01), *Kruskal-Wallis* (não pareado) e *Wilcoxon* (pareado).

Nos experimentos com HUVEC pré-incubadas com o inibidor SC-514 (1  $\mu$ M), não observou-se nenhuma diferença na expressão de ICAM-1 (**FIGURA 18A**) e E-selectina (**FIGURA 18B**) na superfície das HUVEC, quando co-incubadas com plqs CON ou plqs SS. A padronização da concentração do inibidor SC-514 foi realizada previamente (métodos), e a concentração de 1  $\mu$ M (60min, 37°C, 5% CO<sub>2</sub>) reduziu significativamente a expressão de ICAM-1 e E-selectina (dados não mostrados), em HUVEC quando pré-incubadas com TNF- $\alpha$  (10 ng/mL, 3h, 37°C, 5% CO<sub>2</sub>).

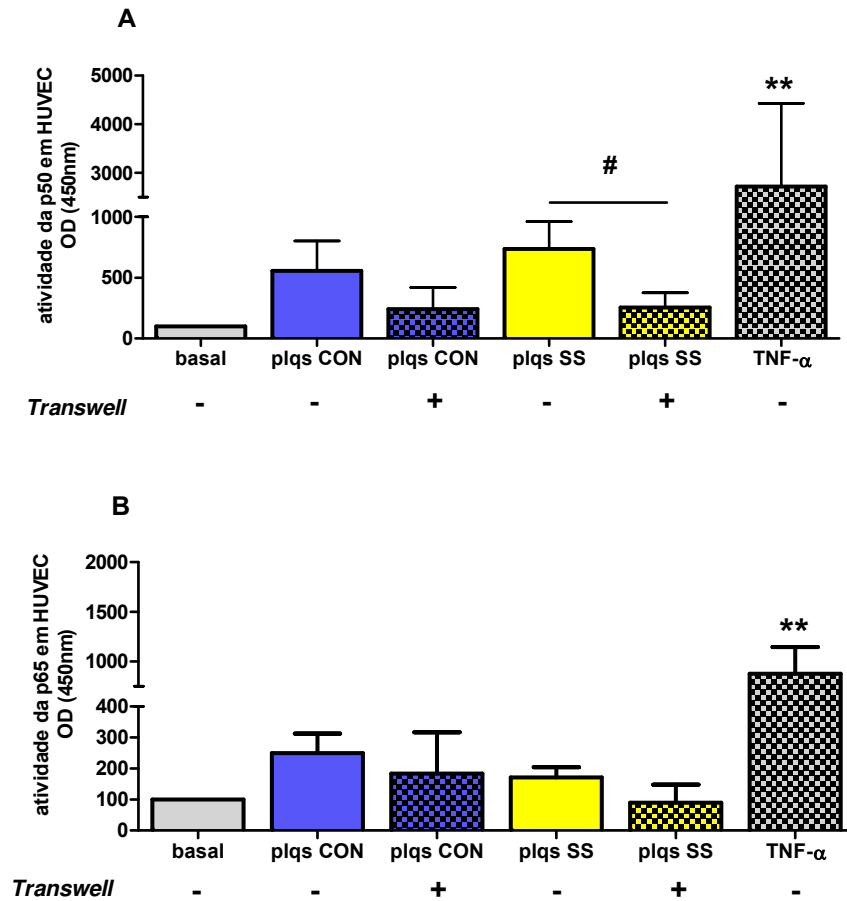
Portanto, os dados apresentados podem indicar que provavelmente apenas a proteína I $\kappa$ B $\alpha$  e não a IKKB, esteja envolvida na ativação do NF- $\kappa$ B endotelial induzida por plqs SS, pois apenas o BAY 11-7082 reduziu significativamente as expressões de ICAM-1 e E-selectina nas HUVEC quando co-incubadas com plaquetas de pacientes AF.



**FIGURA 18: O efeito do inibidor da via NF- $\kappa$ B, SC-514, na expressão das moléculas de adesão ICAM-1 (A) e E-selectina (B), em co-culturas de HUVEC com plaquetas.** HUVEC foram pré-incubadas com SC-514 (SC; 1  $\mu$ M), durante 30min (37°C, 5% CO<sub>2</sub>), e em seguida, incubadas na presença de plqs CON (n=20) ou plqs SS (n=22) por 4h (37°C, 5% CO<sub>2</sub>). (A) Expressão de ICAM-1 (anti-CD54-PE) e de (B) E-selectina (anti-CD62E-APC) avaliadas por citometria de fluxo; \*p<0,05 e \*\*p<0,01 comparado à expressão basal (n=22). Testes não paramétricos ANOVA (p<0,01), *Kruskal-Wallis* (não pareado) e *Wilcoxon* (pareado).

### 5.12- Resultados preliminares: ativação do NF- $\kappa$ B endotelial após co-cultura com plaquetas

A atividade das proteínas nucleares p50 e p65, que correspondem as subunidades do NF- $\kappa$ B, foram avaliadas através de kits de ELISA (*Active Motif*). Primeiramente, as proteínas nucleares (extratos nucleares) foram obtidas das HUVEC após co-cultura com plaquetas CON ou plaquetas SS, com ou sem suportes de *transwell* (4h; 37°C, 5% CO<sub>2</sub>). Nós investigamos o quanto essas plaquetas são capazes de ativarem o NF- $\kappa$ B endotelial, em experimentos de co-cultura, e correlacionamos com os resultados já mostrados. As HUVEC também foram pré-estimuladas com TNF- $\alpha$  (10 ng/mL; 3h, 37°C, 5% CO<sub>2</sub>) como controle positivo de ativação, e os resultados mostraram que há um aumento significativo das proteínas p50 (**FIGURA 19A**) e p65 (**FIGURA 19B**) em relação à atividade basal. Entretanto, não foram observadas diferenças significativas na atividade dessas proteínas quando as HUVEC foram co-incubadas com plqs CON ou plqs SS, exceto ao suporte de *transwell* que reduziu significativamente a atividade da p50 na presença de plqs SS (**FIGURA 19A**), em relação à co-cultura em contato direto. Esses dados são preliminares e não podemos afirmar o quanto as plqs SS são capazes de ativarem as proteínas do NF- $\kappa$ B, devido ao “n” experimental (poucas amostras). No entanto, podemos inferir que possivelmente a ativação do NF- $\kappa$ B (p50) foi mais eficiente quando as HUVEC foram co-incubadas em contato direto com as plaquetas de pacientes AF, mas novos experimentos serão necessários a confirmação dos dados.



**FIGURA 19:** Atividade da p50 e da p65 em células endoteliais após à co-cultura com plaquetas, com ou sem suportes de *transwell*. HUVEC ( $1 \times 10^6$  céls/poço) foram co-incubadas ou não com plaquetas ( $1 \times 10^8$  plqs/poço) com ou sem suportes de *transwell* (poro da membrana de  $0,4 \mu\text{m}$ ) 4h,  $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$ . HUVEC também foram pré-estimuladas com TNF- $\alpha$  (10ng/mL, 3h,  $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$ ). A atividade das proteínas nucleares p50 e p65 foram mensuradas por ELISA. (A) atividade da p50; \*\* $p < 0,01$  comparado ao basal; # $p < 0,05$  comparado ao sem *transwell*; (B) atividade da p65; \*\* $p < 0,01$  comparado ao basal; plqs CON ( $n \geq 2$ ) e plqs SS ( $n = 6$ ), teste não-paramétrico ANOVA  $p = 0,009$  Kruskal-Wallis (não-pareado) e Wilcoxon (pareado).

## ***6. DISCUSSÃO***

---



A principal função das plaquetas é impedir o sangramento quando há lesão tecidual, através da formação de um “tampão hemostático” ou coágulo que ativa toda a cascata de coagulação. As plaquetas também contribuem para manter a integridade do endotélio e atuam nos processos inflamatórios (VAN GILS *et al.*, 2009). O aumento da ativação plaquetária já foi descrito em pacientes AF (WUN *et al.*, 1998 e 1999, TOMER *et al.*, 2001); e as plaquetas, quando ativadas, possuem alta capacidade inflamatória, pois podem secretar proteínas inflamatórias, como o fator plaquetário 4 (PF4), RANTES, IL-8, beta-tromboglobulinas ( $\beta$ -TGs), IL-1 $\beta$ , proteínas microbiais e mediadores lipídicos (VON HUNDELSHAUSEN & WEBER 2007). A habilidade das plaquetas de pacientes AF de aderir à matriz extracelular, e aos leucócitos e células endoteliais (WUN *et al.*, 1997 e 2002), pode indicar que as plaquetas possuem um papel importante no processo vaso-oclusivo. Alguns estudos já mostraram que as plaquetas AF interagem com monócitos e células vermelhas (WUN *et al.*, 1997 e 2002, BRITTAIN *et al.*, 2008). Em nosso laboratório, encontramos dados que indicam que as plaquetas de pacientes com AF tem propriedades adesivas elevadas; esta adesão provavelmente é intermediada pela molécula de adesão P-selectina e a integrina  $\alpha_{IIb}\beta_3$  ativada (glicoproteína GPIIb/IIIa) (FERREIRA *et al.*, 2008, PROENÇA-FERREIRA *et al.*, 2010). A vaso-oclusão na AF é a principal causa de morbidade entre os pacientes, que resulta da interação entre células vermelhas, leucócitos, plaquetas e células endoteliais ativadas na microvasculatura, em associação aos processos inflamatórios e estresse oxidativo, causando a obstrução do fluxo sanguíneo (CONRAN & COSTA 2009).

No estudo atual, confirmamos que as plaquetas de pacientes AF apresentam propriedades adesivas aumentadas, pois se encontram em estado ativado na circulação. Nossos resultados mostraram um aumento na expressão das moléculas de adesão P-selectina e da integrina  $\alpha_{IIb}\beta_3$  ativada, na superfície das plaquetas de pacientes AF. A ativação da P-selectina ocorre na superfície da plaqueta durante o rolamento da mesma sobre as células endoteliais, na circulação sanguínea. Já a integrina  $\alpha_{IIb}\beta_3$ , quando ativada, atua na estabilização da adesão às células endoteliais e na formação do agregado plaquetário (VAN GILS *et al.*, 2009).

Nos ensaios de adesão de fluxo (microfluídica), as plaquetas SS apresentaram uma tendência a aderirem mais às proteínas do fibrinogênio e colágeno, em comparação à

adesão de plaquetas de indivíduos controles saudáveis (CON). Também foi observada maior tendência na adesão de plaquetas SS à monocamada de células endoteliais, em condições estáticas, quando comparado à adesão de plaquetas CON. Entretanto, os resultados de adesão microfluídica e estática embora não sejam estatisticamente significativos, corroboram com os resultados já publicados (FERREIRA *et al.*, 2008; PROENÇA-FERREIRA *et al.*, 2010), os quais indicam que as plaquetas de pacientes AF apresentam um aumento das suas propriedades adesivas.

Sabe-se que a importante molécula de adesão intercelular-1, ICAM-1 está mais expressa na superfície das células quando ativadas, atuando como indicador de ativação endotelial. A E-selectina também é expressa na superfície de células endoteliais ativadas e intermedeia o rolamento de plaquetas e leucócitos ao endotélio. As plaquetas ligam-se ao ICAM-1 do endotélio, via integrina  $\alpha_{IIb}\beta_3$  presente na superfície das plaquetas, e o fibrinogênio faz a ponte desta ligação estabilizando a adesão das plaquetas ao endotélio, e, conseqüentemente aumentando a expressão de outras moléculas de adesão (CD40L, P-selectina), além de estimular a liberação de proteínas inflamatórias (IL-1 $\beta$  e PF4), (VAN GILS *et al.*, 2009). ICAM-1 também é um importante ligante para a adesão de leucócitos ao endotélio (VAN GILS *et al.*, 2009), enquanto que a E-selectina medeia as interações endoteliais com outras células, e desempenha um papel na ativação de integrinas de leucócitos, aumentando suas propriedades adesivas (HIDALGO *et al.*, 2009). O contato entre plaquetas de pacientes AF e uma monocamada de célula endoteliais (HUVEC), em ensaios de co-cultura, resultou no aumento da expressão das moléculas de adesão ICAM-1 e E-selectina, mas não da molécula de adesão VCAM-1 na superfície das HUVEC. A citocina inflamatória TNF- $\alpha$  aumentou a expressão de todas as moléculas de adesão estudadas (ICAM-1, E-selectina e VCAM-1), e foi utilizada como um controle positivo de ativação. Esses resultados podem sugerir que plaquetas de pacientes AF apresentam propriedades inflamatórias (de uma maneira similar ao TNF- $\alpha$ ), pois aumentaram as expressões de ICAM-1 e E-selectina na superfície das HUVEC. Contudo, esses dados contradizem BELCHER e colaboradores (2000), pois em ensaios de co-culturas semelhantes aos nossos, relataram que plaquetas de pacientes AF sozinhas não são capazes de induzirem a expressão de ICAM-1 e E-selectina na superfície das HUVEC, exceto quando os leucócitos são adicionados às co-culturas de plaquetas com HUVEC. Os nossos

resultados são consistentes e confiáveis, pois avaliamos um “n” experimental maior que o publicado por BELCHER e colaboradores (2000).

Para confirmarmos se a ativação das moléculas de adesão na superfície das células endoteliais, induzida por plaquetas SS, dependeria ou não do contato físico (direto) entre plaquetas AF e HUVEC, outros ensaios de co-culturas foram realizados com suportes de *transwell*. As plaquetas permaneceram no compartimento superior e as HUVEC no compartimento inferior, e apenas o meio de cultura foram compartilhados entre as células. A expressão de ICAM-1 na superfície das HUVEC foi inibida em cerca de 45%, e a expressão de E-selectina foi inibida em cerca de 85%, após co-cultura com plaquetas de pacientes SS na presença dos suportes de *transwells*. Portanto, a ativação e expressão de ICAM-1 e E-selectina na superfície de células endoteliais, mediada por plaquetas de pacientes AF, aparentemente depende do contato direto para que ocorra.

Podemos sugerir que a adesão de plaquetas AF induz a ativação do endotélio, pois aumentam a expressão de moléculas de adesão na superfície endotelial. No entanto não podemos excluir a possível participação de micropartículas provenientes destas plaquetas (MPP), porque através do poro da membrana do transwell (0,4  $\mu\text{m}$ ) algumas MPP poderiam atravessar. As micropartículas são fragmentos de membrana celulares liberadas por diversas células; as MPP tem diâmetro que varia de 0,1-0,5  $\mu\text{m}$  (pequenas) e até 1  $\mu\text{m}$  (grandes) e são positivas para fosfatidilserina (PS), anexina V, e encontram-se elevadas em pacientes com diabetes, síndrome coronariana aguda, falência renal crônica, hipertensão (MARTINEZ *et al.*, 2005 e PEREIRA *et al.*, 2006) e em pacientes AF (SHET *et al.*, 2003; VAN BEERS *et al.*, 2009). Analisamos por citometria de fluxo, utilizando um anticorpo específico para plaquetas (anti-CD41a-FITC; subunidade  $\alpha_{\text{IIb}}$  da integrina  $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$  combinado com Anexina V), e a porcentagem de MPP do meio de cultura dos compartimentos superior (suspensão de plaquetas) e inferior (HUVEC) do *transwell*, após 4h de co-cultura foi analisada. Notamos que a porcentagem de MPP que migraram do compartimento superior para o inferior, através do poro da membrana foi inferior a 1% em relação ao total de MPP do compartimento superior (80%), dados não mostrados. Na parte superior do *transwell* encontramos um número não quantificável de MPP de tamanhos inferiores a 0,4  $\mu\text{m}$  (resultados não mostrados). Portanto, não podemos descartar completamente a participação de MPP na ativação das células endoteliais observada.

A interleucina 8 (IL-8) é uma importante citocina inflamatória que apresenta propriedades quimiotáticas em neutrófilos. Ela é secretada por diversos tipos celulares, como monócitos, neutrófilos, fibroblastos, células endoteliais e plaquetas. As HUVEC, em condições *in vitro* e sob estímulo inflamatório (TNF- $\alpha$ ), secretam altos níveis da citocina IL-8 no sobrenadante de cultura quando comparado à secreção basal. Os resultados mostraram que, no sobrenadante de plaquetas SS, os níveis de IL-8 são ligeiramente maiores quando comparado às plaquetas CON. Entretanto, em condições de co-cultura com HUVEC, a presença das plaquetas SS aumentou os níveis de IL-8 no sobrenadante das células endoteliais HUVEC com relação aos níveis basais. Além disso, também em condições de co-cultura, os níveis dessa citocina foram maiores em comparação aos níveis observados do sobrenadante de cultura de plaquetas (sem HUVEC). Portanto, acreditamos que a IL-8 quantificada no sobrenadante das co-culturas foi liberada, predominantemente, pelas células endoteliais ativadas, e não pelas plaquetas. Os nossos resultados indicam que a interação entre plaquetas de pacientes AF e células endoteliais induziu a produção e liberação de IL-8 pelas HUVEC.

Os pacientes AF apresentam níveis elevados de citocinas inflamatórias no plasma (TNF- $\alpha$ , IL-8, IL-1, IL-6), e dados prévios reportaram que as plaquetas de indivíduos AF apresentam propriedades inflamatórias, pois liberam altos níveis das citocinas LIGHT (GARRIDO *et al.*, 2012) e CD40L (GARRIDO *et al.*, em preparação). A interleucina 1 beta (IL-1 $\beta$ ) é uma importante citocina inflamatória secretada por diversos tipos celulares, como monócitos, macrófagos, células NK, plaquetas, fibroblasto e células endoteliais. O plasma de pacientes com AF apresenta altos níveis de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  (LANARO *et al.*, 2009). Em condições basais, as HUVEC secretam baixa quantidade de IL-1 $\beta$ , mesmo após receberem estímulo com TNF- $\alpha$ . Os resultados mostraram que tanto as plaquetas CON quanto as plaquetas SS liberam IL-1 $\beta$ . Entretanto, as plaquetas de pacientes AF liberam mais IL-1 $\beta$  quando comparado às plaquetas CON. Em condições de co-cultura de HUVEC com plaquetas, os níveis de IL-1 $\beta$  no sobrenadante foram significativamente maiores, após a co-incubação com plaquetas SS em contato direto em comparação ao basal e sob estímulo de TNF- $\alpha$ . A quantidade de IL-1 $\beta$  no sobrenadante de plaquetas e das co-culturas foram similares, no entanto, como as plaquetas SS também liberam uma quantidade maior de IL-1 $\beta$ , é provável que o IL-1 $\beta$  quantificado no sobrenadante da co-cultura seja

produzido e liberado pelas próprias plaquetas SS. Estes dados podem sugerir que a presença das HUVEC induz a produção da citocina inflamatória IL-1 $\beta$  pelas plaquetas SS. Por outro lado, as plaquetas SS liberam concentrações de IL-1 $\beta$  muito maiores do que as plaquetas CON, podendo contribuir no agravamento de quadros clínicos na AF, já que a citocina IL-1 $\beta$  possui um efeito muito potente na ativação de células endoteliais (GAWAZ *et al.*, 2000). Assim sendo, esse pode ser um dos mecanismos pelo qual a plaqueta AF é capaz de induzir a ativação do endotélio.

O fator plaquetário 4 (PF4) é liberado por plaquetas e pode ficar depositado na superfície das células endoteliais, e conseqüentemente pode contribuir para a ativação de moléculas de adesão na superfície dessas células (YU *et al.*, 2005). Esta quimiocina é armazenada nos alfa grânulos presentes no interior das plaquetas, e atua na agregação plaquetária. A liberação do PF4 pelas plaquetas foi quantificada do sobrenadante de plaquetas CON ou SS, e os dados mostraram que as plaquetas SS liberam altos níveis de PF4 após 4h de cultura, em comparação às plaquetas CON. Portanto, a produção e liberação do PF4 pelas plaquetas de indivíduos AF na circulação podem contribuir na ativação da cascata de coagulação nesses pacientes, e conseqüentemente, ativar células endoteliais.

Os resultados de expressão gênica por qRT-PCR, mostraram que após co-cultura de células endoteliais com plaquetas SS, e o estímulo de TNF- $\alpha$ , a expressão do gene *ICAM1* nas HUVEC aumentou. Esses resultados estão de acordo com dados obtidos por citometria de fluxo, pois a co-incubação com plaquetas de pacientes AF aumentou a expressão de ICAM-1 na superfície das HUVEC. Sugere-se que o aumento na expressão do gene *ICAM1* esteja associado com a ativação de genes envolvidos na via de sinalização do fator de transcrição NF- $\kappa$ B, o qual tem um papel importante na ativação endotelial, já que o NF- $\kappa$ B é capaz de ativar outros genes que codificam moléculas de adesão, citocinas, quimiocinas, metaloproteinases da matriz extracelular e fator tissular (MONACO & PALEOLOG 2004).

A expressão do gene *NF $\kappa$ B1A* (subunidade p50 do NF- $\kappa$ B) foi avaliada por qRT-PCR e o resultado demonstrou que as plaquetas de pacientes AF induziram a expressão desse gene em HUVEC após a sua co-incubação com essas plaquetas. Sob o estímulo de TNF- $\alpha$ , também houve um aumento na expressão desse gene. No citoplasma da célula, o

NF- $\kappa$ B está inativo, mas a sua ativação ocorre pela fosforilação da proteína I $\kappa$ B $\alpha$  através das proteínas quinases (IKK $\alpha$ , IKK $\beta$ ). Quando ativado, o NF- $\kappa$ B é translocado para o núcleo e atua como um fator de transcrição nuclear gênica. A ativação do NF- $\kappa$ B pode ocorrer por estímulos intra ou extracelulares, como citocinas, espécies reativas de oxigênio (ROS), radiação ultravioleta, bactérias e vírus (SPINELLI *et al.*, 2010). Segundo KOLLANDER e colaboradores (2010) a subunidade p50 do NF- $\kappa$ B em células mononucleares regula a expressão do fator tissular endotelial em camundongos transgênicos com anemia falciforme.

O gene *RELA* que corresponde a subunidade p65 do fator NF- $\kappa$ B está presente em diversos tipos celulares, e no endotélio é o mais importante ativador de diversas vias de sinalização da inflamação (ENENSTEIN *et al.*, 2010). A expressão do gene *RELA* em HUVEC não apresentou diferença de expressão após a co-cultura com plaquetas CON ou SS, exceto sob o estímulo de TNF- $\alpha$  quando a sua expressão foi maior quando comparada entre os grupos. Portanto, apenas o gene que codifica a subunidade p50 (*NF $\kappa$ B1A*), e não a subunidade p65 (*RELA*) das HUVEC, apresentou um aumento na sua expressão após a co-incubação das HUVEC com plaquetas de pacientes AF.

Sabe-se que as plaquetas, quando ativadas, podem induzir à ativação do NF- $\kappa$ B em células endoteliais, e podem alterar as propriedades adesivas e quimiotáticas dessas células em pacientes com aterosclerose (GAWAZ *et al.*, 2000). A utilização do inibidor BAY 11-7082 (inibe a proteína I $\kappa$ B $\alpha$  da via NF- $\kappa$ B) foi capaz de reverter o efeito das plaquetas CON e SS na ativação da molécula de adesão ICAM-1. Além de inibir a expressão de E-selectina nas plaquetas SS. Esses resultados podem indicar que a ativação endotelial induzida por plaquetas de indivíduos AF é dependente da via de sinalização NF- $\kappa$ B, já que resultados similares já foram relatados com monócitos de indivíduos AF (BELCHER *et al.*, 2000).

Entretanto, não existem trabalhos na literatura que comprovam a influência de plaquetas de indivíduos AF na ativação do NF- $\kappa$ B endotelial. Assim sendo, nossos resultados são inéditos e sugerem que o contato direto e/ou as proteínas inflamatórias liberadas por essas plaquetas induzem a expressão gênica em células endoteliais, após co-culturas. Sugerimos que a presença das plaquetas de pacientes AF seja capaz de induzir a expressão, e possivelmente a ativação de importantes proteínas que participam da via de

sinalização NF- $\kappa$ B, em células endoteliais. O uso de terapias capazes de inibir a ativação do NF- $\kappa$ B é sugerido, pois podem diminuir as crises de vaso-oclusão, como potenciais alvos terapêuticos a utilização de drogas inibidoras de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  (BELCHER *et al.*, 2000).

Neste estudo, foram utilizadas plaquetas de pacientes AF em estado estável, que estavam ou não em terapia com HU. Todos os nossos resultados com os pacientes foram mantidos em um mesmo grupo, porque estatisticamente não foram observadas diferenças entre pacientes com ou sem HU. Em alguns casos, as plaquetas de pacientes com HU induziram mais a expressão de moléculas de adesão nas células endoteliais, assim como na liberação de citocinas inflamatórias, quando comparado às plaquetas de pacientes sem HU. Como a HU conhecidamente melhora o quadro clínico de pacientes AF, diminuindo fatores de coagulação e a inflamação (LANARO *et al.*, 2009), esperava-se que o efeito das plaquetas destes pacientes em células endoteliais fosse menos significativo do que o efeito das plaquetas de pacientes AF que não estavam sob a terapia com HU. No entanto, essa expectativa não se tornou realidade no decorrer dos experimentos. Esta observação talvez possa ser explicada pelo fato de que a maioria dos pacientes AF que está atualmente em terapia com HU apresenta um quadro mais grave comparado aos pacientes que não estão em terapia com HU. Há cerca de 2 anos atrás nossos resultados apresentavam-se diferentes dos atuais, pois os pacientes em terapia com HU exibiam as propriedades adesivas reduzidas em suas plaquetas (PROENÇA-FERREIRA *et al.*, 2010). A terapia com HU foi associada ao aumento da trombospondina 1 no plasma de pacientes AF (NOVELLI *et al.*, 2012), e as citocinas LIGHT e CD40L derivadas de plaquetas não estão diminuídas no plasma de pacientes em terapia com HU, quando comparado aos pacientes sem HU (GARRIDO *et al.*, 2012). O certo é que muitos pacientes acabam descontinuando o tratamento com HU sem comunicar o médico responsável, dificultando assim o estabelecimento da dose correta da droga. Alguns autores sugerem que a HU seja utilizada por pacientes mais graves em alguns centros (NOVELLI *et al.*, 2012), e os pacientes que não estão utilizando HU representariam um fenótipo mais brando. Portanto, o uso crescente da terapia com HU nos pacientes AF, e o fato de que atualmente os pacientes que não utilizam essa droga geralmente apresentam um quadro clínico mais brando, fizeram

com que os nossos resultados obtidos com os pacientes AF fossem agrupados em um único grupo para a tese e publicação do artigo.

O uso de drogas com ação antiplaquetária (inibe a ativação plaquetária) como a aspirina, dipiridinamole e heparina, em pacientes AF, é muito discutido (CHAPLIN *et al* 1980 e 1989, OSAMO *et al* 1981, CHARNESKI & CONGDON 2010), entretanto, são necessários mais estudos para maiores esclarecimentos. Estudos recentes com novos agentes antiplaquetários estão sendo testados, como o *prasugrel*, um antagonista do receptor de adenosina difosfatode (ADP), o P2Y (JAKUBOWSKI *et al.*, 2012); o *eptifibatide*, um antagonista da integrinas  $\alpha_{IIb}\beta_3$  utilizado durante as crises de dor (vaso-oclusão), (DESAI 2012, JAKUBOWSKI *et al.*, 2012, LEE *et al.*, 2007, WUN *et al.*, 2013), e todos podem contribuir para a terapia de pacientes portadores de anemia falciforme.

## ***7. CONCLUSÃO***

---



Em conclusão, nossos dados evidenciam que as plaquetas circulam em estado ativado na anemia falciforme (AF), demonstrada pelo aumento das propriedades inflamatórias das plaquetas de pacientes AF. Estas participam da ativação endotelial, pois são capazes de induzirem a expressão de moléculas de adesão na superfície das células endoteliais, e de proteínas inflamatórias e adesivas. A ação das plaquetas AF na ativação endotelial depende do contato direto ou via adesão célula-célula, entre plaquetas e células endoteliais com a participação da via de sinalização NF- $\kappa$ B. Em associação ao aumento das propriedades adesivas das plaquetas de indivíduos AF, os pacientes AF apresentam um número maior de plaquetas circulantes e isto poderia contribuir para o aumento da ativação endotelial, e consequentemente para os eventos de vaso-occlusão. Portanto, Os nossos dados são importantes e corroboram com a nossa hipótese de que as plaquetas, provavelmente, participam no processo de vaso-occlusão na anemia falciforme, pois apresentam a capacidade de ativar células endoteliais (*in vitro*) tornando-as inflamatórias e mais adesivas. Portanto, sugerimos que as plaquetas representam um importante alvo para novas abordagens terapêuticas na anemia falciforme.



## ***8.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS***

---



- Albelda SM, Buck CA. Integrins and other cell adhesion molecules. *FASEB J* 1999; 4 (11): 2868-80.
- Amoyal I, Fibach E. Hemoglobin switch in the newborn: a flow cytometry analysis. *Neonatology* 2007;91(1): 61-8.
- Araújo AS. Protocolos de transfusão em hemoglobinopatias. In: Hemoterapia – Fundamentos e Prática. Bordin JO, Langhi Junior DM, Covas DT (Eds.), São Paulo, Atheneu, 2007.
- Aslan M, Ryan TM, Adler B, Townes TM, Parks DA, Thompson JA et al. Oxygen radical inhibition of nitric oxide-dependent vascular function in sickle cell disease. *PNAS*. 2001; 26(98):15215-20.
- Assis A, Conran N, Canalli AA, Lorand-Metze I, Saad STO, Costa FF. Effect of cytokines and chemokines on sickle neutrophil adhesion to fibronectin. *Acta Haematol* 2005; 113 (2): 130-6.
- Beg AA, Rubens SM, Scheinman RI, Haskill S, Rosen CA, Baldwin AS. I $\kappa$ B interacts with the nuclear localization sequences of the subunit of NF- $\kappa$ B: a mechanism for cytoplasmic retention. *Genes Dev* 1992; 6: 1899-1913.
- Belcher JD, Marker PH, Weber JP, Hebbel RP, Vercellotti GM. Activated monocytes in sickle cell disease: potential role in the activation of vascular endothelium and vaso-occlusion. *Blood* 2000; (7):2451-9.
- Belcher JD, Mahaseth H, Welch TE, Vilback AE, Sonbol KM, Kalambur VS et al. Critical role of endothelial cell activation in hypoxia-induced vasoocclusion in transgenic sickle mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2005; 288:H2715-25.
- Bellavite P, Andriolli G, Guzzo P, Arigliano P, Chirumbolo S, Manzato F, Santonastaso C. A colorimetric method for the measurement of platelet adhesion in microtiter plates. *Anal Biochem* 1994; 216 (2): 444-50.
- Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976; (72): 248.
- Brittain JE, Parise LV. The  $\alpha$ 4 $\beta$ 1 integrin in sickle cell disease. *Transfus Clin Biol* 2008; (1-2): 19-22.

- Bunn H, Forget BG. Hemoglobin: molecular, genetic and clinical aspects. Published by WB Saunders, Philadelphia, Pennsylvania, US. 1986.
- Canalli AA, Conran N, Fattori A, Saad ST, Costa FF. Increased adhesive properties of eosinophils in sickle cell disease. *Exp Hematol* 2004; 32 (8): 728-34.
- Canalli AA, Costa FF, Saad ST, Conran N. Granulocytic adhesive interactions and their role in sickle cell vaso-occlusion. *Hematology* 2005; 10 (5): 419-25.
- Canalli AA, Franco-Penteado CF, Traina F, Saad ST, Costa FF, Conran N. Role for cAMP-protein kinase A signalling in augmented neutrophil adhesion and chemotaxis in sickle cell disease. *Eur J Haematol* 2007; 79 (4): 330-7.
- Canalli AA, Franco-Penteado CF, Traina F, Saad STO, Conran N, Costa FF. Increased adhesive properties of neutrophils in sickle cell disease may be reversed by pharmacological nitric oxide donation. *Haematologica* 2008; 93 (4): 605-9.
- Cardoso GL, Guerreiro JF. African gene flow to north Brazil as revealed by HBB\*S gene haplotype analysis. *Am J Hum Biol.* 2006;18(1):93-8.
- Chaplin HJr, Alkjaersig N, Fletcher AP, Michael JM, Joist JH. Aspirin-dipyridamole prophylaxis of sickle cell disease pain crises. *Thrombosis and Haemostasis* 1980, 43, 218-21.
- Chaplin HJr, Monroe MC, Malecek AC, Morgan LK, Michael J, Murphy WA. Preliminary trial of minidose heparin prophylaxis for painful sickle cell crises. *East African Medical Journal* 1989; 66, 574-584.
- Charache S, Terrin ML, Moore RD, Dover GJ, Barton FB, Eckert SV, McMahon RP, Bonds DR. Effect of hydroxyurea on the frequency of painful crises in sickle cell anaemia. Investigators of the Multicenter Study of Hydroxyurea in Sickle Cell Anaemia. *N Engl J Med* 1995; 332(20): 1317-22.
- Charneski L, Congdon HB. Effects of antiplatelet and anticoagulant medications on the vasoocclusive and thrombotic complications of sickle cell disease: A review of the literature. *American Journal of Health-System Pharmacy* 2010, 67, 895-900.

- Cokic VP, Smith RD, Beleslin-Cokic BB, Njoroge JM, Miller JL, Gladwin MT, Schechter AN. Hydroxyurea induces fetal hemoglobin by the nitric oxide-dependent activation of soluble guanylyl cyclase. *J Clin Invest* 2003; 111(2): 231-39.
- Collins T. Endothelial nuclear factor- $\kappa$ B and the initiation of the atherosclerotic lesion. *Lab Invest* 1993; 68: 499-508.
- Collins T, Read MA, Neish AS, Whitley MZ, Thanos D, Maniatis T. Transcriptional regulation of endothelial cell adhesion molecules: NF- $\kappa$ B and cytokine-inducible enhancers. *FASEB J* 1995; 9: 899-909.
- Conran N, Ikuta T, Saad STO, Costa FF. Increased GM-CSF levels in sickle cell disease are associated with increased leukocyte counts and are reversed by hydroxyurea. *Blood* 2007; 104: 3573.
- Conran N, Costa FF. Hemoglobin disorders and endothelial cell interactions. *Clin Biochem* 2009; 4, 1-15.
- Costa FF. Anemia Falciforme. In: Zago MA, Falcão RP, Pasquini R. *Hematologia Fundamentos e Prática*. São Paulo: Ed. Atheneu, 2004, Cap. 30, p. 289-308.
- Croizat H, Nagel RL. Circulating cytokines response and the level of erythropoiesis in sickle cell anemia. *Am J Hematol* 1999; 60 (2), 105-15.
- Desai PCBJ; Jones S, McDonald A, Wilson JrDR, Dominik R, Key NS, Parise LV, Ataga KI. A Pilot Study of Eptifibatide for Treatment of Acute Pain Episodes in Sickle Cell Disease *Blood* 2012, 120, 2102.
- Duits AJ, Pieters RC, Saleh AW, Van Rosmalen E, Katerberg H, Berend K, Rojer RA. Enhanced levels of soluble VCAM-1 in sickle cell patients and their specific increment during vasoocclusive crisis. *Clin Immun Immunopath* 1996; 81(1), 96-8.
- Enenstein J, Milbauer L, Domingo E, Wells A, Roney M, Kiley J, Wei P, Hebbel RP. Proinflammatory phenotype with imbalance of KLF2 and RelA: risk of childhood stroke with sickle cell anemia. *Am J Hematol* 2010; (1) 18-23.
- Ferreira RP, Franco-Penteado CF, Saad STO, Costa FF, Conran N. Platelets from sickle cell disease individuals demonstrate increased adhesive properties that are reversed by

- hydroxyurea therapy in association with alterations in intraplatelet cAMP and GPIIb/IIIa integrin activation. *Blood* 2008; 112:2472.
- Frenette PS, Johnson RC, Hynes RO, Wagner DD. Platelet rolling on stimulated endothelium in vivo: an interaction mediated by endothelial P-selectin. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 7450-54.
- Frenette PS, Moyna C, Hartwell DW, Lowe JB, Hynes RO, Wagner DD. Platelet-endothelial interactions in inflamed mesenteric venules. *Blood* 1998; 91: 1318-24.
- Galley HF, Webster NR. Physiology of the endothelium. *Br J Anaesth* 2004;93:105-13.
- Gambero S, Canalli AA, Traina F, Albuquerque DM, Saad STO, Costa FF. Therapy with hydroxyurea reduces adhesion molecule gene and protein expression in sickle red cells with a concomitant reduction in adhesive properties. *Eur J Haematol*, 2007; 144-51.
- Garrido VT, Proenca-Ferreira R, Dominical VM, Traina F, Bezerra MA, de Mello MR, Colella MP, Araujo AS, Saad ST, Costa FF, Conran N. Elevated plasma levels and platelet-associated expression of the pro-thrombotic and pro-inflammatory protein, TNFSF14 (LIGHT), in sickle cell disease. *Br J Haematol* 2012, 158, 788-97.
- Gawaz M, Brand K, Dickfeld T, Pogatsa-Murray G, Page S, Bogner C, Koch W, Schömig A, Neumann F. Platelets induce alterations of chemotactic and adhesive properties of endothelial cells mediated through an interleukin-1-dependent mechanism. Implications for atherogenesis. *Atherosclerosis* 2000; (1):75-85.
- Gladwin MT, Shelhamer JH, Ognibene FP, Pease-Fye ME, Nichols JS, Link B et al. Nitric oxide donor properties of hydroxyurea in patients with sickle cell disease. *Br. J. Haematol.* 2002;116:436-44.
- Halsey C, Roberts IA. The role of hydroxyurea in sickle cell disease. *Br J Haematol.* 2003;120(2):177-86.
- Henkel T, Zabel U, Van Zeek K, Muller JM, Faning E, Baeuerle P. Intramolecular masking of the nuclear location signal and dimerization domain in the precursor for the p50 NF- $\kappa$ B subunit. *Cell* 1992; 68: 1121-33.

- Hidalgo A, Chang J, Jang JE, Peired AJ, Chiang EY, Frenette PS. Heterotypic interactions enabled by polarized neutrophil microdomains mediated thrombo-inflammatory injury. *Nat Med* 2009, 15 (4): 384-91.
- Hillery CA, Du MC, Wang WC, Scott JP. Hydroxyurea therapy decreases the in vitro adhesion of sickle erythrocytes to thrombospondin and laminin. *Br J Haematol* 2000; 109 (2): 322-7.
- Hynes RO. Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell* 2002; 110: 673-87.
- Hynes RO. Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell* 1992;69:11-25.
- Jakubowski JA, Zhou C, Small DS, Winters KJ, Lachno DR, Frelinger AL, 3rd, Howard J, Mant TG, Jurcevic S, Payne CD. A Phase 1 Study of Prasugrel in Patients with Sickle Cell Disease: Pharmacokinetics and Effects on ex Vivo Platelet Reactivity. *Br J Clin Pharmacol* 2012, 75 (6): 1433-44.
- Johnson FL, Look AT, Gockerman J et al. Bone marrow transplantation in a patient with sickle cell anemia. *N Engl J Med* 1984; 311:780-3.
- Kierzenbaum AL. *Histologia e Biologia Celular: Uma Introdução à Patologia*. Elsevier 2004; 11-3. Rio de Janeiro.
- King SB. Nitric oxide production from hydroxyurea. *Free Radical Biology & Medicine*. 2004;37(6):737-44.
- Kollander R, Solovey A, Milbauer LC, Abdulla F, Kelm RJJ, Hebbel RP. Nuclear factor-kappa B (NFkappaB) component p50 in blood mononuclear cells regulates endothelial tissue factor expression in sickle transgenic mice: implications for the coagulopathy of sickle cell disease. *Transl Res* 2010; (4):170-77.
- Krishnamurti L. Hematopoietic cell transplantation for sickle cell disease: state of the art. *Expert Opin Biol Ther* 2007; 7:161-72.
- Kulkarni S, Dopheide SM, Yap CL, Ravanat C, Freund M, Mangin P, et al. A revised model of platelet aggregation. *J Clin Invest* 2000; 105:783-91.

- Lanaro C, Franco-Penteado CF, Albuquerque DM, Saad STO, Conran N, Costa FF. Altered levels of cytokines and inflammatory mediators in plasma and leucocytes of sickle cell anemia patients and effects of Hydroxyurea therapy. *J Leukoc Biol* 2008; 85 (2): 235-42.
- Lassmann G, Thelander L, Graslund A. EPR stopped-flow studies of reaction of the tyrosyl radical of protein R2 from ribonucleotide reductase with hydroxyurea. *Biochem Biophys Res Commun*. 1992;188(2): 879-87.
- Lee SP, Ataga KI, Zayed M, Manganello JM, Orringer EP, Phillips DR, Parise LV. Phase I study of eptifibatide in patients with sickle cell anaemia. *Br J Haematol* 2007, 139, 612-620.
- Mackman N, Brand K, Edgington TS. Lipopolysaccharide-mediated transcriptional activation of the human tissue factor gene in THP-1 monocytic cells requires both activator protein 1 and nuclear factor kappa B binding sites. *J Exp Med* 1991; 174: 1517-26.
- Madigan C, Malik P. Pathophysiology and therapy for haemoglobinopathies. Part I: sickle cell disease. *Expert Rev Mol Med* 2006; 8:1–23.
- Martinez MC, Tesse A, Zobairi F, Andriantsitohaina R. Shed membrane microparticles from circulating and vascular cells in regulating vascular function. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005; H1004-9.
- Miguel LI, Almeida CB, Traina F, Canalli AA, Dominical VM, Saad ST, Costa FF, Conran N. Inhibition of phosphodiesterase 9A reduces cytokine-stimulated in vitro adhesion of neutrophils from sickle cell anemia individuals. *Inflamm Res* 2011, 60 (7): 633-42.
- Monaco C, Paleolog E. Nuclear factor  $\kappa$ B: a potential therapeutic target in atherosclerosis and thrombosis. *Cardiovascular Research* 2004; 61: 671-82.
- Nathan C. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB J*. 1992; 6(12): 3051-64.
- Novelli EM, Kato GJ, Ragni MV, Zhang Y, Hildesheim ME, Nouraie M, Barge S, Meyer, MP, Hassett AC, Gordeuk VR, Gladwin MT, Isenberg JS. Plasma thrombospondin-1 is increased during acute sickle cell vaso-occlusive events and associated with acute chest

- syndrome, hydroxyurea therapy, and lower hemolytic rates. *Am J Hematol* 2012; 87, 326-330.
- Okpala, I. Leukocyte adhesion and the pathophysiology of sickle cell disease. *Current Opinion in Hematology* 2006;13:40-4.
- Osamo NO, Photiades DP, Famodu A.A. Therapeutic effect of aspirin in sickle cell anaemia. *Acta Haematologica* 1981, 66, 102-107.
- Pereira J, Alfaro G, Goycoolea M, Quiroga T, Ocqueteau M, Massardo L, et al. Circulating platelet-derived microparticles in systemic lupus erythematosus. Association with increased thrombin generation and procoagulant state. *Thromb Haemost* 2006; 94-9.
- Platt OS. Sickle cell anemia as an inflammatory disease. *The Journal of Clinical Investigation* 2000; (106): 3.
- Pobber JS, Min W, Bradley JR. Mechanisms of Endothelial Dysfunction, Injury, and Death. *Annu Rev Pathol. Mech. Dis.* 2009;4:72-95.
- Proença-Ferreira R, Franco-Penteado C F, Traina F, Saad S T, Costa F F, Conran N. Increased adhesive properties of platelets in sickle cell disease: roles for  $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ -mediated ligand binding, diminished cAMP signaling and increased phosphodiesterase 3A activity. *Br J Haematol* 2010; 149, 280-88.
- Rosse WF, Mohandas N, Petz LD, Steinberg MH. New views of sickle cell disease, pathophysiology and treatment. *Hematology (Am Soc Hematol Educ Program)* 2000; 2-17.
- Rother RP, Bell L, Hillmen P, Gladwin MT. The clinical sequelae of intravascular hemolysis and extracellular plasma hemoglobin. A novel mechanism of human disease. *JAMA* 2005; 293(13):1653-62.
- Ruggeri ZM. Plateletes in atherothrombosis. *Nat Med* 2002; 8:1227-34.
- Serjeant GR. The emerging understanding of sickle cell disease. *Br J Haematol* 2001; 112 (1): 3-18.
- Setty BN, Betal SG, Zhang J, Stuart MJ. Heme induces endothelial tissue factor expression: potencial role in hemostatic activation in patient with hemolytic anemia. *J Thromb Haemost.* 2008;6:2202-9.

- Shet AS, Aras O, Gupta K, Hass MJ, Rausch DJ, Saba N, et al. Sick blood contains tissue factor-positive microparticles derived from endothelial cells and monocytes. *Blood* 2003; 102 (7): 2678-83.
- Spinelli SL, Casey AE, Pollock S, Gertz JM, McMillan DH, Narasipura SD, et al. Platelets and Megakaryocytes Contain Functional Nuclear Factor- $\kappa$ B. *Arterioscler Throm Vasc Biol* 2010; 30: 591-8.
- Stuart MJ, Nagel RL. Sick cell disease. *Lancet* 2004; 364: 1343-60.
- Steinberg MH. Management of sickle cell disease. *N Engl Med*, 1999; 340: 1021-30.
- Steinberg MH, Barton F, Castro, Pegelow CH, Ballas SK, Kutlar A et al. Effect of hydroxyurea on mortality and morbidity in adult sickle cell anemia: Risks and benefits up to 9 years of treatment. *JAMA* 2003;289:1645-51.
- Tomer A, Harker LA, Kasey S, Eckman JR. Thrombogenesis in sickle cell disease. *J Lab Clin Med* 2001; 137 (6): 398-407.
- Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, Speleman F. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol* 2002; (7): 1-12.
- van Beers EJ, Schaap MC, Berckmans RJ, Nieuwland R, Sturk A, van Doormaal FF, Meijers JC, Biemond BJ, CURAMA study group. Circulating erythrocyte-derived microparticles are associated with coagulation activation in sickle cell disease. *Haematologica* 2009; (11):1513-9.
- van Gils JM, Zwaginga JJ, Hordijk PL. Molecular and functional interactions among monocytes, platelets, and endothelial cells and their relevance for cardiovascular diseases. *J Leukoc Biol* 2009; (2):195-204.
- Varga-Szarbo D, Pleines I, Nieswant B. Cell Adhesion Mechanisms in Platelets. *Arterioscler ThrombVasc Biol* 2008; 28: 403-12.
- Villagra J, Shiva S, Hunter LA, Machado RF, Gladwin MT, Kato GJ. Platelet activation in patients with sickle disease, hemolysis-associated pulmonary hypertension, and nitric oxide scavenging by cell-free hemoglobin. *Blood* 2007; 110 (6): 2166-72.

- von Hundelshausen P, Weber C. Platelets as immune cells: bridging inflammation and cardiovascular disease. *Circ Res* 2007; (1):27-40.
- Yarbro JW. Mechanism of action of hydroxyurea. *Seminars on Oncology* 1992;19:1-10.
- Yasin Z, Witting S, Palascak MB, Joiner CH, Rucknagel AL, Franco RS. Phosphatidylserine externalization in sickle red blood cells: associations with cell, age, density and hemoglobin F. *Blood* 2003;102(1):365-70.
- Yu G, Rux AH, Ma P, Bdeir K, Sachais BS. Endothelial expression of E-selectin is induced by the platelet-specific chemokine platelet factor 4 through LRP in an NF- $\kappa$ B-dependent manner. *Blood* 2005; (105): 3545-51.
- Waldow T, Witt W, Weber E, Matschke K. Nitric oxide donor-induced persistent inhibition of cell adhesion protein expression and NF- $\kappa$ B activation in endothelial cells. *Nitric Oxide* 2006; (15): 103–13.
- Wun T, Paglieroni T, Tablin F, Welborn J, Nelson K, Cheung A. Platelet activation and platelet-erythrocyte aggregates in patients with sickle cell anemia. *J Lab Clin Med* 1997; (5):507-16.
- Wun T, Paglieroni T, Rangaswami A, Franklin PH, Welborn J, Cheung A, Tablin F. Platelet Activation in Patients with Sickle Cell Disease. *Br J Haematol* 1998; (100) 741-49.
- Wun T, Paglieroni T, Field CL, et al. Platelet-erythrocyte adhesion in sickle cell disease. *J Investig Med* 1999; 47:121-27.
- Wun T, Cordoba M, Rangaswami A, Cheung AW, Paglieroni T. Activated monocytes and platelet-monocyte aggregates in patients with sickle cell disease. *Clin Lab Haematol* 2002, 24, 81-88.
- Wun T, Soulieres D, Frelinger AL, Krishnamurti L, Novelli EM, Kutlar A, Ataga KI, et al. A double-blind, randomized, multicenter phase 2 study of prasugrel versus placebo in adult patients with sickle cell disease. *J Hematol Oncol* 2013, 6, 17.



## ***9. ANEXOS***

---



**Termo de Consentimento Livre e Esclarecido da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP (aprovado em 15/12/2009), Adendo que inclui o Centro Infantil Boldrini (aprovado em 22/11/2011).**



FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS  
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

[www.fcm.unicamp.br/pesquisa/etica/index.html](http://www.fcm.unicamp.br/pesquisa/etica/index.html)

CEP, 15/12/09.  
(Grupo III)

**PARECER CEP:** N° 1170/2009 (Este n° deve ser citado nas correspondências referente a este projeto)  
**CAAE:** 0899.0.146.000-09

**I - IDENTIFICAÇÃO:**

**PROJETO:** “INTERAÇÕES ENTRE PLAQUETAS DE PACIENTES COM ANEMIA FALCIFORME E CULTURAS DE CÉLULAS ENDOTELIAIS HUMANAS DE CORDÃO UMBILICAL (HUVEC): AVALIAÇÃO IN VITRO DA ADESÃO DE PLAQUETAS E SEU EFEITO NA ATIVAÇÃO ENDOTELIAL”.

**PESQUISADOR RESPONSÁVEL:** Renata Proença Ferreira

**INSTITUIÇÃO:** Hemocentro/UNICAMP

**APRESENTAÇÃO AO CEP:** 06/12/2009

**APRESENTAR RELATÓRIO EM:** 15/12/10 (O formulário encontra-se no *site* acima)

**II - OBJETIVOS**

Investigação da capacidade de plaquetas de pacientes com anemia falciforme (AF) aderirem às células endoteliais e a identificação das moléculas de adesão envolvidas neste processo, bem como o efeito dessas plaquetas na ativação endotelial.

**III - SUMÁRIO**

Trata-se de um estudo experimental *in vitro*, comparativo de três grupos, a partir de doação de sangue de pacientes com anemia falciforme, tratados ou não com hidroxiuréia e voluntários sadios. A hipótese testada é que as plaquetas de doentes AF participam do processo da vaso-oclusão através de ensaios de adesão *in vitro* com células endoteliais de cordão umbilical.

**IV - COMENTÁRIOS DOS RELATORES**

Trata-se de um projeto de doutorado, com rigor metodológico e muito bem redigido. A competência e histórico dos pesquisadores envolvidos justificam a boa escolha do tema, já contemplando com o financiamento FAPESP. Todo material utilizado será proveniente de kits comerciais e a amostra de sangue coletada será em torno de 12-16 ml. O Termo de Consentimento Livre e Esclarecido está bem redigido, em linguagem acessível e completo.

**V - PARECER DO CEP**

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, após acatar os pareceres dos membros-relatores previamente designados para o presente caso e atendendo todos os dispositivos das Resoluções 196/96 e complementares, resolve aprovar sem

Comitê de Ética em Pesquisa - UNICAMP  
Rua: Tessália Vieira de Camargo, 126  
Caixa Postal 6111  
13083-887 Campinas – SP

FONE (019) 3521-8936  
FAX (019) 3521-7187  
[cep@fcm.unicamp.br](mailto:cep@fcm.unicamp.br)

- 1 -



restrições o Protocolo de Pesquisa, o Termo do Consentimento Livre e Esclarecido, bem como todos os anexos incluídos na pesquisa supracitada.

O conteúdo e as conclusões aqui apresentados são de responsabilidade exclusiva do CEP/FCM/UNICAMP e não representam a opinião da Universidade Estadual de Campinas nem a comprometem.

## VI - INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES

O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (Res. CNS 196/96 – Item IV.1.f) e deve receber uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado (Item IV.2.d).

Pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou (Res. CNS Item III.1.z), exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade do regime oferecido a um dos grupos de pesquisa (Item V.3.).


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

Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Em caso de projeto do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma junto com o parecer aprovatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial (Res. 251/97, Item III.2.e)

Relatórios parciais e final devem ser apresentados ao CEP, de acordo com os prazos estabelecidos na Resolução CNS-MS 196/96.

## VII – DATA DA REUNIÃO

Homologado na XII Reunião Ordinária do CEP/FCM, em 15 de dezembro de 2009.

  
**Prof. Dra. Carmen Silvia Bertuzzo**  
VICE-PRESIDENTE do COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA  
FCM / UNICAMP



CEP, 22/11/11.  
(PARECER CEP: Nº 1170/2009)

**FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS  
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA**

[www.fcm.unicamp.br/fcm/pesquisa](http://www.fcm.unicamp.br/fcm/pesquisa)

## **PARECER**

### **I – IDENTIFICAÇÃO:**

**PROJETO: “INTERAÇÕES ENTRE PLAQUETAS DE PACIENTES COM ANEMIA FALCIFORME E CULTURAS DE CÉLULAS ENDOTELIAIS HUMANAS DE CORDÃO UMBILICAL (HUVEC): AVALIAÇÃO IN VITRO DA ADESÃO DE PLAQUETAS E SEU EFEITO NA ATIVAÇÃO ENDOTELIAL”.**

**PESQUISADOR RESPONSÁVEL:** Renata Proença Ferreira

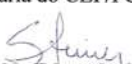
### **II – PARECER DO CEP.**

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP tomou ciência e aprovou o adendo que inclui o Centro Infantil Boldrini como campo de coleta de dados e a nova versão do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, referente ao protocolo de pesquisa supracitado.

O conteúdo e as conclusões aqui apresentados são de responsabilidade exclusiva do CEP/FCM/UNICAMP e não representam a opinião da Universidade Estadual de Campinas nem a comprometem.

### **III – DATA DA REUNIÃO.**

Homologado na XI Reunião Ordinária do CEP/FCM, em 22 de novembro de 2011.

  
**Prof. Dr. Carlos Eduardo Steiner**  
PRESIDENTE do COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA  
FCM / UNICAMP

Comitê de Ética em Pesquisa - UNICAMP  
Rua: Tessália Vieira de Camargo, 126  
Caixa Postal 6111  
13083-887 Campinas – SP

FONE (019) 3521-8936  
FAX (019) 3521-7187  
[cep@fcm.unicamp.br](mailto:cep@fcm.unicamp.br)

Página 1 de 1



## ***10. APÊNDICE***

---



## 10.1- Apêndice I: Artigo em fase de elaboração (pré-submissão).

### Endothelial Activation by Platelets from Sickle Cell Anemia Patients

Renata Proença-Ferreira, Ana Flávia Brugnerotto, Vanessa Tonin Garrido, Marilene de Fátima Reis Ribeiro, Melissa Ercolin dos Santos; Fabíola Traina, Sara T.O. Saad, Fernando Ferreira Costa and Nicola Conran.

Running title: SCA Platelets Induce Endothelial Activation

#### Abstract

The pathophysiology of sickle cell anemia (SCA) is associated with a hypercoagulable state that may contribute to the initiation and propagation of vaso-occlusion. Increased platelet activation has been described in SCA and SCA platelets may present augmented adhesion to the vascular endothelium, potentially contributing to vaso-occlusion. We sought to observe the effects of platelets (PLTs) from healthy individuals and SCA individuals on the expression and production of adhesive molecules and inflammatory proteins by endothelial cells *in vitro*, and to investigate the signaling pathway that may mediate this effect. Human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) were cultured, in the presence, or not, of washed PLTs from healthy control individuals or steady-state SCA patients. Supernatants were reserved for cytokine quantification by ELISA, and adhesion molecules on the surface of HUVEC were analyzed by flow cytometry; gene expressions of *ICAM1* and genes of the NF- $\kappa$ B pathway were analyzed by qPCR. SCA PLTs were found to be more inflammatory, displaying increased adhesive properties, increased productions of IL-1 $\beta$  and PF4 and an elevated expression of P-selectin and  $\alpha_{IIb}\beta_3$  in its activated state. Following culture in the presence of SCA PLTs, HUVEC demonstrated increased ICAM-1 and E-selectin expressions, increased IL-8 production and increased *ICAM1* and *NF $\kappa$ B1A* (encodes p50 subunit of NF- $\kappa$ B) gene expressions. Interestingly, transwell inserts abolished the effects of SCA PLTs on ICAM-1 and E-selectin expression. and an inhibitor of the NF- $\kappa$ B pathway, BAY 11-7082, inhibited the induction of ICAM-1 and E-selectin expression on HUVEC surface induced by SCA PLTs. In conclusion, we find further evidence to indicate that platelets circulate in an

activated state in sickle cell disease, demonstrating augmented inflammatory properties. SCA platelets are capable of stimulating endothelial cell activation, as demonstrated by the induction of the increased expression of endothelial inflammatory and adhesive proteins. This effect appears to be mediated by direct contact, or even adhesion, between the platelets and endothelial cells and via an NF $\kappa$ B-dependent signaling pathway, therefore, the vaso-occlusive process in sickle cell disease and provide further evidence to support the use of anti-platelet approaches in association with other therapies for SCD.

### **Introduction**

Sickle cell anemia is a genetic disease caused by the production of abnormal hemoglobin S (HbS), which polymerizes under hypoxic conditions, resulting in the formation of sickled red blood cells that are less flexible and are liable to lysis. The disease is characterized by vaso-occlusive processes and hemolytic events that cause irreversible damage to organs and manifestations that include painful vaso-occlusive crises, acute chest syndrome, stroke, osteonecrosis, leg ulcers and cardiac disease (Stuart and Nagel 2004). The vaso-occlusive process is the consequence of a complex pathophysiology that involves chronic vascular inflammation, hypoxia-reperfusion processes, oxidative stress and reduced nitric oxide bioavailability with ensuing endothelial activation and the adhesion of red and white cells to the vascular wall, leading to compromised blood flow of the small and microcirculatory blood vessels (Conran, *et al* 2009).

Thrombotic complications, including ischemic stroke, can occur in sickle cell disease (SCD) (Adams 2007) and platelet activation and a hypercoagulable state are now thought to contribute to SCD pathophysiology (Sparkenbaugh and Pawlinski 2013). Activation of the coagulation system and augmented thrombin generation in SCD (Noubouossie, *et al* 2013) is indicated by reports of increased plasma levels of prothrombin fragment 1.2 (F1.2), thrombin anti-thrombin (TAT) (Peters, *et al* 1994, Stuart and Setty 2001) and D-dimer levels (Francis 1989), as well as increased tissue factor (TF) expression in patients (Colella, *et al* 2012, Setty, *et al* 2012, Solovey, *et al* 1998). Platelets of SCA patients (SCA platelets) are known to circulate in an activated state (Kenny, *et al* 1980, Proenca-Ferreira, *et al* 2010, Wun, *et al* 1998), presenting increased aggregation and increased adhesive properties under static conditions (Proenca-Ferreira, *et al* 2010). SCA

platelets are reported to present an increased expression of adhesion molecules and markers of platelet activation, such as CD40 ligand (CD40L), on their surface (Lee, *et al* 2006, Proenca-Ferreira, *et al* 2010, Tomer 2004) and produce higher levels of potent inflammatory cytokines, such as LIGHT (TNFSF14) (Garrido, *et al* 2012). Furthermore, increased circulating levels of platelet microparticles and platelet-derived proteins, such as thrombospondin-1 (TSP-1) and platelet factor 4 (PF4), are a further indication of platelet activation in SCD (Browne, *et al* 1996, Novelli, *et al* 2012, Tomer, *et al* 2001, Wun, *et al* 1998).

The exact mechanism by which platelets may be activated in SCD is not clear, but the release of adenosine diphosphate (ADP) from lysed red blood cells may contribute to platelet activation (Wun, *et al* 1997), and the exposure of phosphatidyl serine (PS) on the surface of sickle red blood cell is also suggested to activate platelets, via induction of thrombin generation (Setty, *et al* 2000, Setty, *et al* 2001) and the consequent reduction interplatelet cAMP (Proenca-Ferreira, *et al* 2010). Low NO may also activate platelets in SCD. SCD platelets can also form circulating heterocellular aggregates with monocytes and neutrophils, where the adhesion of platelets to these leukocytes is suggested to participate in their activation and subsequent adhesion to the endothelium (Polanowska-Grabowska, *et al* 2010, Wun, *et al* 2002). Furthermore, activated  $\alpha_{IIb}\beta_3$  expression has been previously correlated to the severity of pulmonary hypertension in SCD and also to laboratory markers of haemolysis, such as reticulocyte count (Villagra, *et al* 2007).

While a role for the platelet in SCD pathophysiology seems apparent, whether the platelets have a direct role in the vasoocclusive process is not clear. We hypothesize that the close proximity or adhesion of activated platelets to the vascular endothelium may contribute to the activation of endothelium in SCD, an event that is central to the vasoocclusive process. We sought to observe the effects of platelets (PLTs) from healthy individuals and SCA individuals on the expression and production of adhesive molecules and inflammatory proteins by endothelial cells *in vitro*, and to investigate the signaling pathway that may mediate this effect.

## **Material and Methods**

### **Materials**

Human fibrinogen and BAY 11-7082 ((E)3-[(4-Methylphenyl)sulfonyl]-2-propenenitrile) were purchased from Calbiochem (La Jolla, CA, USA); collagen type I was bought from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA); Ham's F12K, Gibco-Invitrogen (Carlsbad, CA, USA) medium, fetal bovine serum and trypsin/EDTA solution, were obtained from Sigma Chemical (Saint Louis, MO, USA). Recombinant TNF- $\alpha$ ; and kits using commercially available sandwich enzyme immunoassay (ELISA) for interleukin-8 (IL-8), interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) and Platelet Factor 4 (PF4) were from R&D Systems (Minneapolis, MN, USA). Tissue culture plates (6 wells) were supplied by Costar (USA); Cell culture Inserts 30 mm (membrane pore size of 0.4  $\mu$ m) from Millipore, Millicell (Ireland) and Glass Whole Blood Tube (ACD Solution A) from Vacutainer<sup>®</sup> (Franklin Lakes, NJ, USA). Antibodies used for flow cytometry, anti-CD62P-fluorescein isothiocyanate (FITC; P-selectin; clone AK-4), PAC-1-FITC (recognize the  $\alpha_{IIb}\beta_3$ ), anti-CD54-phycoerythrin (PE; ICAM-1, clone LB-2), anti-CD106-FITC (VCAM-1, clone 5110C9) and anti-CD62E-Allophycocyanin (APC; E-selectin, clone 68-5H11) were bought from BD Pharmingen (San Diego, CA, USA). Cell line Human Umbilical Vein Endothelial Cells (HUVEC) was bought from American Type Culture Collection (ATCC) CLR 1730<sup>™</sup>, lot 59510065 (Manassas, VA, USA). Transcription factor Assay Kits for NF $\kappa$ B p50 e NF $\kappa$ B p65 were bought from Active Motif (Carlsbad, CA, USA).

### **Patients**

A total of 90 steady-state patients (between 18-53 years old); 16 males and 8 females) were recruited from Boldrini Children's Center for Hematologic Investigations, Campinas, Brazil; 29 males and 37 females were recruited from Hematology and Hemotherapy Center, University of Campinas, Brazil. All patients were diagnosed as homozygous for HbS (using haemoglobin electrophoresis methods and high performance liquid chromatography), participated in the study. All patients attended regular clinics had not experienced painful crisis nor received blood transfusions in the preceding 3 months and had not taken aspirin during the previous 10 days. Patients on hydroxycarbamide (HC) therapy had been taking 15–30 mg/kg per day for at least 3 months. A total of 55 healthy

volunteers (between 19-61 years old); 18 males and 32 females were recruited from The Hematology and Hemotherapy Center, University of Campinas, and 5 females were recruited from Boldrini Children's Center for Hematologic Investigations, Campinas, Brazil. All controls had not taken any medication within the last 10 days were used as controls and age- and gender-matched, as appropriate. See Table I for clinical details of participating patients and healthy controls. Informed written consent was obtained from all patients and controls and the study was approved by the ethics committee of the University of Campinas, Brazil.

### **Culture of endothelial cells**

HUVEC were cultured in 75 cm<sup>2</sup> flasks, and 6-well tissue culture plates with Ham's 12K medium supplemented with endothelial cell growth supplement factor (ECGS; 0.5mg/mL), heparin (0.1mg/mL) and fetal bovine serum (10%). Cells were used after the fourth to sixth passage and cultures were maintained at 37°C under a humidified with 5% CO<sub>2</sub>; the medium was replaced every 2 days until confluence (3-5 days)

### **Preparation of washed platelets**

Platelet rich plasma (PRP) was obtained by centrifugation of whole blood (collected in trisodium citrate, 22.0g / L; citric acid, 8.0 g / L; and dextrose 24.5 g / L, 1.5mL) at 200 g at 21°C for 20 min. PRP was washed once in wash buffer (140 mmol/l NaCl, 5.0 mmol/l KCl, 12 mmol/l sodium citrate, 10 mmol/l glucose and 12.5 mmol/l sacarose, pH 6) and platelets were isolated from the PRP by centrifugation at 800 g at 21°C for 12 min. The platelet pellet was resuspended in F-12K medium (GIBCO by *life* Technologies, Grand Island, NY, USA). Platelet counts were performed using a Beckman Coulter, Inc. (Fullerton, CA, USA). Suspensions were utilized immediately in assays and the anticoagulant utilized did not affect assay results. Control and SCD platelets were treated in the same manner and always run in parallel in platelet assays; thus, differences in properties of platelets reflect differences inherent to these platelets, and are not due to the separation/washing procedure.

### **Cytometry**

The following antibodies were used to detect surface endothelial cells adhesion molecules: phycoerythrin (PE)-conjugated anti-54 (LeuTM-54; intercellular adhesion molecule 1, ICAM-1; clone LB-2) and alofococianina (APC)-conjugated anti-CD62E (E-selectin; clone 68-5H11), all purchased from Becton Dickinson, San Jose, CA, USA. After incubations, the PLTs were removed and the HUVECs were washed once with PBS (phosphate buffered saline, pH=7.4) and detached with trypsin/EDTA solution trypsin (0.25%) and analyzed by Flow Cytometry

### **Quantification of IL-8, IL-1 $\beta$ and PF4 in supernatants**

Levels of IL-8, IL-1 $\beta$  and PF4 were determined in the supernatants of platelets culture ( $1 \times 10^8$  PLTs/well; 4h, 37°C, 5% CO<sub>2</sub>) and of co-cultures (4h, 37°C, 5% CO<sub>2</sub>) of HUVEC ( $1 \times 10^6$  cels/well) with platelets ( $1 \times 10^8$  PLTs/well) from CON individuals and SCD patients enzymelinked immunosorbent assays (ELISA), according to the manufacturer's instructions (R&D Systems).

### **Gene expression of *ICAM1*, *NF $\kappa$ BIA*, *RelA*, *CHUK* and *IKK $\beta$* in endothelial cells**

Extraction of mRNA from HUVEC ( $1-5 \times 10^5$  cells) was perform with RNeasey<sup>®</sup> Micro Kit (Qiagen) and synthesis of cDNA with (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA, USA). Amplification and quantification of gene expression: synthetic oligonucleotide primers were designed to amplify cDNA for conserved regions of the *ICAM1* (encoded by the Intercellular Adhesion Molecule 1 gene), *NF $\kappa$ BIA* (encoded by the p50 subunit for nuclear factor- $\kappa$ B gene, NF- $\kappa$ B), *RelA* (encoded by the p65 subunit for nuclear factor- $\kappa$ B gene, NF- $\kappa$ B), *CHUK* (encoded by the I $\kappa$ B $\alpha$  inhibitor protein for nuclear factor- $\kappa$ B gene, NF- $\kappa$ B) and *IKK $\beta$*  (encoded by the IKK $\beta$  kinase protein for nuclear factor- $\kappa$ B gene, NF- $\kappa$ B); Primer-Express; Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). For primer sequences, see Table II. Primers were synthesized by Invitrogen (São Paulo, Brazil) and ACTB and GAPDH were used as control genes. All samples were assayed in a 12  $\mu$ L volume containing 5 ng cDNA, 6  $\mu$ L SYBR Green Master Mix PCR (Applied Biosystems) and gene primers as well as GAPDH and ACTB primers in 96-well reaction plate (7500 Fast Real-Time PCR System – Applied Biosystems). To confirm accuracy and reproducibility

of real-time PCR, the intra-assay precision was calculated according to the equation:  $E^{(-1/\text{slope})}$  [Vandesompele, J, *et al.*, 2002]. The dissociation protocol was performed at the end of each run to check for non-specific amplification. Two replicas were run on the plate for each sample. Results were expressed as the arbitrary units A.U.) of gene expression when compared with the control genes.

### **In vitro co-culture assay**

HUVEC were co-cultured in plates 6-wells ( $1 \times 10^6$  cels/well) in the presence or absence of PLTs ( $1 \times 10^8$  PLTs/well). Cultures were performed with PLTs from CON, SCD patients and SCD patients with hydroxyurea in direct contact with HUVEC or using the placement of transwell inserts (0.4  $\mu\text{m}$ ) to separate PLTs from HUVEC (4 h, 37°C, 5%  $\text{CO}_2$ ). After incubation, PLTs were removed and the supernatants were reserved and stored (-80°C) for cytokine quantification by ELISA. HUVECs were washed once with PBS and detached with trypsin/EDTA solution (4 min, 37°C) for analyzed by Flow Cytometry or gene expressions were analyzed by real-time polymerase chain reaction (RT-qPCR).

### **Pretreatment of human umbilical vein endothelial cells**

HUVEC were activated with pre-incubated with  $\text{TNF-}\alpha$  (10 ng/mL in medium), before co-culture (3h, 37°C, 5%  $\text{CO}_2$ ) was used for positive control of activation. In the experiments involving pre-treatment of HUVEC with BAY 11-7082 (20  $\mu\text{M}$  in 0.02% dimethylsulfoxide vehicle) during 30 min, 37°C, 5%  $\text{CO}_2$  before performance of the co-cultures assays, and than the PLTs CON and SCD were co-incubated with HUVEC during 4h (37°C, 5%  $\text{CO}_2$ ). Control values were obtained by adding 0.02% (v/v) dimethylsulfoxide only. After co-cultures, PLTs were removed and the HUVECs were washed once with PBS and detached with trypsin/EDTA solution 4 min, 37°C) for analyzed by Flow Cytometry

### **Statistical analysis**

Statistical analyses; data are reported as medians, values for different patient groups were compared by unpaired nonparametric analysis of variance (ANOVA) followed by

Kruskal-Wallis Comparisons test, or the unpaired nonparametric Mann-Whitney test was used for comparisons between two groups.

## RESULTS

### **Platelets from SCA patients demonstrate altered expressions and productions of adhesion molecules and inflammatory proteins**

Platelets of SCA individuals are known to circulate in a partially-activated state. Accordingly, platelets from individuals of our SCA population were found to express a number of inflammatory molecules (Figure 1). Platelets from healthy control individuals and SCA individuals (CON PLTs and SCA PLTs, respectively) were incubated in culture medium for 4 h at 37°C and the productions of the cytokines, IL-1 $\beta$ , platelet factor 4 (PF4) and IL-8 (Figure 1A-C) were determined by ELISA. A trend towards increased productions of IL-1 $\beta$  and PF4 was observed for SCA PLTs, although these increases were not statistically significant. Flow cytometric analysis found that the expression of the adhesion molecule, P-selectin (Figure 1D), on SCA PLTs is increased ( $P=0.06$ ), while the integrin  $\alpha_{IIb}\beta_3$  integrin is found in a more activated state on SCA PLTs (Figure 1E), as demonstrated by increased PAC-1 antibody binding. As such, SCA PLTs appear to be inflammatory cells that may contribute to vascular inflammation by both their adhesion to the vessel wall and due to the production of inflammatory molecules when in close proximity with the endothelium.

### **SCA platelets increase the expression of the adhesion molecules, ICAM-1 and E-selectin, on the surface of HUVEC**

Flow cytometry was utilized to compare the surface expressions of CD54 (ICAM-1), CD62E (E-selectin) and CD106 (VCAM-1) on HUVEC following their incubation, or not, with platelets. Confluent HUVEC were co-cultured in direct contact with platelets from control individuals (CON PLTs), SCA patients (SCA PLTs) or culture medium for 4h (37°C, 5% CO<sub>2</sub>). HUVEC cultured with CON PLTs demonstrated a non-significant increase in surface ICAM-1 and E-selectin (FIGURE 3A and 3B); in contrast, SCA PLTs induced a significant increase in both ICAM-1 and E-selectin on HUVEC, while VCAM-1

expression was not induced by either type of PLT (FIGURE 3A and 3B). A TNF- $\alpha$ -inflammatory stimulus (10 ng/mL) was used as a positive control to observe the effect of a strong inflammatory stimulus on adhesion molecule expression on HUVEC (FIGURE 3).

#### **Transwell inserts abolish the effects of induction of endothelial adhesion molecule expression by platelets**

Repetition of these assays, but with the placement of transwell inserts (0.4  $\mu$ m pores) in culture plates, to separate the PLTs from HUVEC, completely abolished the effects of CON and SCA PLTs on ICAM-1 expression (FIGURE 4A) and on E-selectin expression (Figure 4B). Data indicate that close contact, or possibly adhesion, of the platelets with the HUVEC is required for activation of endothelial adhesion molecule expression.

#### **SCA PLTs increase the production of interleukin-8 (IL-8) in endothelial cell-platelet cultures**

IL-8 is an important inflammatory cytokine and can be produced and released by endothelial cells under basal conditions. Production of IL-8 was significantly augmented in HUVEC cultures that were co-cultured in the presence of SCA, compared to basal levels of production by non-stimulated HUVEC (**FIGURE 5A**). CON PLTs had no significant effect on IL-8 levels in HUVEC cultures, TNF- $\alpha$  significantly increased IL-8 secretion by HUVEC. Platelets also produce and release IL-8, but at low levels when compared to HUVEC (See Figure 1B), thus it seems likely that the IL-8 observed in these cultures may be produced primarily by stimulated HUVEC.

#### **Co-culture of HUVEC with SCA platelets induces expression of endothelial *ICAM1* and genes of the NF- $\kappa$ B pathway**

The effect of co-culture of PLTs with HUVEC on endothelial gene expression was determined by quantitative real-time PCR (qPCR). Confluent HUVEC were co-cultured in direct contact with platelets from control individuals (CON PLTs), SCA patients (SCA PLTs) or culture medium for 4h (37°C, 5% CO<sub>2</sub>); PLTs were removed by gentle washing and HUVEC gene expression determined. Relative gene expression of *ICAM1* increased by

**6.9-fold** in endothelial cells in the presence of SCA PLTs, compared to basal expression, but was not altered in the presence of CON PLTs (**FIGURE 6A**). In contrast, TNF- $\alpha$  increased the *ICAM1* gene expression in HUVEC by **93-fold**, when compared to basal expression (**FIGURE 6A**). The nuclear transcription factor, NF- $\kappa$ B, is a cytoplasmic protein that when activated translocates to the nucleus, under the control of proteins of the NF- $\kappa$ B pathway, inducing the gene expression of a number of genes, including inflammatory molecules, growth factors, and cell adhesion molecules (Barnes and Karin 1997, Finco and Baldwin 1995). Following the incubation of HUVEC with SCA PLTs, but not CON PLTs, the expression of the *NF $\kappa$ B1A* gene (encodes p50 subunit of NF- $\kappa$ B) was significantly increased in HUVEC (Figure 6B). In contrast, the expressions of the *CHUK* gene (encodes I $\kappa$ B $\alpha$  inhibitor protein), the *IKKB* gene (IKKB kinase) and *RELA* (encodes the p65 subunit, forming a heterodimer with p50) by HUVEC were not affected by co-incubation of cells with PLTs (Figure 6C, D and E). Incubation of HUVEC with TNF- $\alpha$  significantly increased the expressions of *NF $\kappa$ B1A* and *RELA*.

#### **Inhibition of the NF- $\kappa$ B pathway abolishes the induction of ICAM-1 and E-selectin on HUVEC by SCA PLTs**

To determine whether the NF- $\kappa$ B signaling pathway mediates the SCA PLT-induced expression of adhesion molecules on the surface of HUVEC, co-cultures of HUVEC and PLTs were co-incubated with BAY 11-7082. BAY 11-7082 selectively and irreversibly inhibits phosphorylation of I $\kappa$ B $\alpha$ , resulting in a decreased activation of NF- $\kappa$ B (Epinat and Gilmore 1999). BAY 11-7082 (20  $\mu$ M) significantly decreased the expressions of both ICAM-1 and E-selectin on the surface of HUVEC, when cells were co-cultured in the presence of SCA PLTs (**FIGURE 7A**). The less significant increase in ICAM-1 expression on HUVEC following incubation of cells with CON PLTs was also abolished by BAY 11-7082 (Figure 7A). Activation of HUVEC by TNF- $\alpha$ , as demonstrated by induction of ICAM-1 expression was also abolished by BAY 11-7082 (data not shown).

#### **Discussion**

Previous reports consistently indicate that platelets appear to circulate in an activated state in SCD. Accordingly, platelets isolated from our current cohort of patients

with SCA presented an increased expression of markers of platelet activation, including P-selectin and an increased presentation of the  $\alpha_{IIb}\beta_3$  integrin in its activated conformation. Productions of the inflammatory cytokines, IL-1 $\beta$  and PF4, were also augmented in SCA platelets, although not significantly, and with some variation between patients. Previous reports on the inflammatory nature of SCA platelets indicate that SCA platelets release increased levels of potent cytokines such as LIGHT (TNF- $\alpha$ ) and CD40L (Garrido *et al.*, 2012), as well as microparticles. In addition, we present further data to indicate that platelets from SCA individuals demonstrate increased adhesive properties; in a previous study, we demonstrated an augmented  $\alpha_{IIb}\beta_3$ -dependent adhesion of SCA platelets under static conditions (Proença-Ferreira *et al.*, 2010). In the present study, we report data to indicate that SCA platelets also demonstrate increased adhesive properties, in vitro, using a microfluidic assay; the Venaflux equipment provides an accurately controlled flow rate that can provide a physiologically-relevant shear stress adjusted to the capillary width employed (400  $\mu$ m). SCA platelets demonstrated increased adhesion to both fibrinogen and HUVEC, compared to platelets from control individuals, strengthening our hypothesis that the adhesion of inflammatory SCA platelets to the blood vessel wall may be important in sickle cell disease.

Platelets from both healthy control individuals and SCA individuals were found to induce the expression of major endothelial adhesion molecules, ICAM-1 and E selectin, on the surface of HUVEC; notably the ability of SCA platelets to induce this expression was more significant and, depending on the SCA individual, levels of expression of these molecules reached levels induced by TNF- $\alpha$  induction. *ICAM1* gene expression by HUVEC was also induced by SCA platelets. ICAM-1 is an important ligand for leukocyte adhesion to the endothelium, while E-selectin-mediated endothelial interactions are also thought to play a role in activating leukocyte integrins, consequently increasing leukocyte adhesive properties and heterotypic interactions with other cell types (Hidalgo *et al.*, 2010). Given the primary role that the adhesion of leukocytes to the vessel wall is thought to play in the vaso-occlusive process, the stimulation of endothelial-leukocyte adhesion molecule expression by activated platelets, may be important in SCD. Further evidence of the activation of the endothelium was provided by the observation that some cultures of

HUVEC and SCA platelets, depending on the individual, produced higher levels of IL-8 cytokine than either HUVEC or SCA platelets alone.

Importantly, the significant effect of SCA platelets on the expression of both ICAM-1 and E-selectin on the surface of HUVEC was almost abolished by the insertion of 0.4  $\mu\text{m}$  transwell inserts in culture wells to separate the platelets from the endothelial cells. Data indicate that either close contact or, even, the adhesion of SCA platelets to HUVEC is required for endothelial activation by SCA platelets, rather than being an effect that is dependent upon the release of inflammatory molecules by platelets. Platelets from SCA individuals are known to produce increased quantities of microparticles, which could play a role in endothelial activation. In addition to their pro-coagulatory properties, microparticles released from activated platelets can be internalized by endothelial cells, where they can release miR-223 and Ago2•miR-233, both able to regulate endothelial gene expression (Laffont *et al.*, Blood in press 2013). However, while platelet MP have been related to measure up to 1  $\mu\text{m}$  in size, flow cytometry analyses indicate that MPs released from both resting and activated platelets measure predominantly between 0.1-0.4  $\mu\text{m}$ . As such, it seems likely that the 0.4  $\mu\text{m}$ -transwell inserts employed herein would not prevent the majority of platelet microparticles from reaching the endothelial cells, further supporting the hypothesis that direct contact between the platelets and the endothelium imparted the alterations, although the participation of platelet MP release cannot be ruled out.

Interestingly, SCA platelets induced the gene expression of *NFkBIA*, encoding the p50 subunit of the NF $\kappa$ B transcription factor. Furthermore, an inhibitor of NF $\kappa$ B signaling, BAY 11-7082, reversed the effects of both CON and SCA platelets on the induction of ICAM-1 expression by HUVEC and inhibited the E-selection expression induced by SCA platelets. These data indicate that activation of endothelial cells by SCA platelets appears to occur via an NF $\kappa$ B-dependent signaling pathway. Similarly, activated monocytes from SCD individuals have been previously found to activate endothelial cell cultures in a cytokine- and NF $\kappa$ B-dependent manner; however, cell-to-cell contact was not required for the effect of activated monocytes on endothelial cells (Belcher *et al.*, blood 2000). Such reports reinforce the multicellular nature of inflammation, endothelial activation and ensuing vaso-occlusion in SCD.

In the present study, data were acquired using platelets isolated both from steady-state SCA patients that were not in use of hydroxyurea (HU) and also from patients in use of HU. Statistical analyses revealed that the use of HU did not significantly alter the effect of SCA platelets on endothelial activation; moreover, in some cases, platelets from some patients that were on HU therapy activated endothelium more than platelets from some patients not on HU. While we previously (Proença-Ferreira *et al.*, 2010) found that HU therapy may be associated with a reduction in platelet activation, more recent studies increasingly reveal some alterations in the current pathophysiological profile of SCA patients. HU therapy, for example, has been associated with an increase in platelet-derived plasma thrombospondin-1 in SCD patients (Novelli *et al.*, 2012) and platelet-derived LIGHT cytokine and CD40L are not significantly altered in SCA patients on HU, compared to those not on HU (Garrido *et al.*, 2012). Due to the ethical issues of discontinuing HU therapy in patients that fill the criteria for the use of this drug, and the transversal nature of these studies cited, it is difficult to determine whether HU therapy has no significant effect upon some aspects of platelet activation or inflammatory status, or whether, as previously suggested (Novelli *et al.*, 2012), HU therapy is now so widely used for patients with more severe SCA that, at some centers, nearly all those patients that are not in use of HU represent the patients with the mildest phenotype. Longitudinal studies would be required to establish whether HU therapy has an effect on the inflammatory status of SCA platelets.

The potential benefits of antiplatelet medications have long been discussed for SCD; earlier studies to investigate the effects of aspirin, dipyridamole and heparin, however, were inconclusive (Chaplin, *et al* 1980, Chaplin, *et al* 1989, Charneski and Congdon 2010, Osamo, *et al* 1981). More recent ongoing trials of antiplatelet agents include those that have employed prasugrel, a P2Y(12) adenosine phosphate (ADP) receptor antagonist that inhibits platelet activation and aggregation, and eptifibatide, an  $\alpha_{iib}\beta_3$ -integrin antagonist, that has also been used during acute pain episodes (Desai 2012, Jakubowski, *et al* 2012, Lee, *et al* 2007, Wun, *et al* 2013).

In conclusion, we find further evidence to indicate that platelets circulate in an activated state in sickle cell disease, demonstrating augmented inflammatory properties. SCA platelets are capable of stimulating endothelial cell activation, as demonstrated by the

induction of the increased expression of endothelial inflammatory and adhesive proteins. This effect appears to be mediated by direct contact, or even adhesion, between the platelets and endothelial cells and via an NF $\kappa$ B-dependent signaling pathway. In addition to the increased adhesive properties displayed by SCA platelets, it should not be forgotten that numbers of circulating platelets are generally considerably higher in SCA, as such both the quantity and activation state of platelets may contribute to endothelial activation and, therefore, the vaso-occlusive process in sickle cell disease and provide further evidence to support the use of anti-platelet approaches in association with other therapies for SCD.

## References

- Adams, R.J. (2007) Big strokes in small persons. *Archives of Neurology*, **64**, 1567-1574.
- Barnes, P.J. & Karin, M. (1997) Nuclear factor-kappaB: a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. *New England Journal of Medicine*, **336**, 1066-1071.
- Browne, P.V., Mosher, D.F., Steinberg, M.H. & Hebbel, R.P. (1996) Disturbance of plasma and platelet thrombospondin levels in sickle cell disease. *American Journal of Hematology*, **51**, 296-301.
- Chaplin, H., Jr., Alkjaersig, N., Fletcher, A.P., Michael, J.M. & Joist, J.H. (1980) Aspirin-dipyridamole prophylaxis of sickle cell disease pain crises. *Thrombosis and Haemostasis*, **43**, 218-221.
- Chaplin, H., Jr., Monroe, M.C., Malecek, A.C., Morgan, L.K., Michael, J. & Murphy, W.A. (1989) Preliminary trial of minidose heparin prophylaxis for painful sickle cell crises. *East African Medical Journal*, **66**, 574-584.
- Charneski, L. & Congdon, H.B. (2010) Effects of antiplatelet and anticoagulant medications on the vasoocclusive and thrombotic complications of sickle cell disease: A review of the literature. *American Journal of Health-System Pharmacy*, **67**, 895-900.
- Colella, M.P., De Paula, E.V., Conran, N., Machado-Neto, J.A., Annicchino-Bizzacchi, J.M., Costa, F.F., Saad, S.T. & Traina, F. (2012) Hydroxyurea is associated with reductions in hypercoagulability markers in sickle cell anemia. *J Thromb Haemost*, **10**, 1967-1970.
- Conran, N., Franco-Penteado, C.F. & Costa, F.F. (2009) Newer aspects of the pathophysiology of sickle cell disease vaso-occlusion. *Hemoglobin*, **33**, 1-16.
- Desai, P.C.B., J.; Jones, S., McDonald, A.; Wilson Jr. D.R.; Dominik, R.; Key, N.S.; Parise, L.V.; Ataga, K. I. (2012) A Pilot Study of Eptifibatide for Treatment of Acute Pain Episodes in Sickle Cell Disease *Blood*, **120**, 2102.
- Epinat, J.C. & Gilmore, T.D. (1999) Diverse agents act at multiple levels to inhibit the Rel/NF-kappaB signal transduction pathway. *Oncogene*, **18**, 6896-6909.
- Finco, T.S. & Baldwin, A.S. (1995) Mechanistic aspects of NF-kappa B regulation: the emerging role of phosphorylation and proteolysis. *Immunity*, **3**, 263-272.
- Francis, R.B., Jr. (1989) Elevated fibrin D-dimer fragment in sickle cell anemia: evidence for activation of coagulation during the steady state as well as in painful crisis. *Haemostasis*, **19**, 105-111.
- Garrido, V.T., Proenca-Ferreira, R., Dominical, V.M., Traina, F., Bezerra, M.A., de Mello, M.R., Colella, M.P., Araujo, A.S., Saad, S.T., Costa, F.F. & Conran, N. (2012) Elevated plasma levels and platelet-associated expression of the pro-thrombotic and pro-inflammatory protein, TNFSF14 (LIGHT), in sickle cell disease. *British Journal of Haematology*, **158**, 788-797.
- Jakubowski, J.A., Zhou, C., Small, D.S., Winters, K.J., Lachno, D.R., Frelinger, A.L., 3rd, Howard, J., Mant, T.G., Jurcevic, S. & Payne, C.D. (2012) A Phase 1 Study of Prasugrel in Patients with Sickle Cell Disease: Pharmacokinetics and Effects on ex Vivo Platelet Reactivity. *British Journal of Clinical Pharmacology*.
- Kenny, M.W., George, A.J. & Stuart, J. (1980) Platelet hyperactivity in sickle-cell disease: a consequence of hyposplenism. *Journal of Clinical Pathology*, **33**, 622-625.
- Lee, S.P., Ataga, K.I., Orringer, E.P., Phillips, D.R. & Parise, L.V. (2006) Biologically active CD40 ligand is elevated in sickle cell anemia: potential role for platelet-mediated inflammation. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, **26**, 1626-1631.

- Lee, S.P., Ataga, K.I., Zayed, M., Manganello, J.M., Orringer, E.P., Phillips, D.R. & Parise, L.V. (2007) Phase I study of eptifibatide in patients with sickle cell anaemia. *British Journal of Haematology*, **139**, 612-620.
- Noubouossie, D.C., Le, P.Q., Rozen, L., Ziereisen, F., Willems, D., Demulder, A. & Ferster, A. (2013) Thrombin generation in children with sickle cell disease: relationship with age, hemolysis, transcranial doppler velocity, and hydroxyurea treatment. *European Journal of Haematology*.
- Novelli, E.M., Kato, G.J., Ragni, M.V., Zhang, Y., Hildesheim, M.E., Nouraie, M., Barge, S., Meyer, M.P., Hassett, A.C., Gordeuk, V.R., Gladwin, M.T. & Isenberg, J.S. (2012) Plasma thrombospondin-1 is increased during acute sickle cell vaso-occlusive events and associated with acute chest syndrome, hydroxyurea therapy, and lower hemolytic rates. *American Journal of Hematology*, **87**, 326-330.
- Osamo, N.O., Photiades, D.P. & Famodu, A.A. (1981) Therapeutic effect of aspirin in sickle cell anaemia. *Acta Haematologica*, **66**, 102-107.
- Peters, M., Plaat, B.E., ten Cate, H., Wolters, H.J., Weening, R.S. & Brandjes, D.P. (1994) Enhanced thrombin generation in children with sickle cell disease. *Thrombosis and Haemostasis*, **71**, 169-172.
- Polanowska-Grabowska, R., Wallace, K., Field, J.J., Chen, L., Marshall, M.A., Figler, R., Gear, A.R. & Linden, J. (2010) P-selectin-mediated platelet-neutrophil aggregate formation activates neutrophils in mouse and human sickle cell disease. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, **30**, 2392-2399.
- Proenca-Ferreira, R., Franco-Penteado, C.F., Traina, F., Saad, S.T., Costa, F.F. & Conran, N. (2010) Increased adhesive properties of platelets in sickle cell disease: roles for alphaIIb beta3-mediated ligand binding, diminished cAMP signalling and increased phosphodiesterase 3A activity. *British Journal of Haematology*, **149**, 280-288.
- Setty, B.N., Key, N.S., Rao, A.K., Gayen-Betal, S., Krishnan, S., Dampier, C.D. & Stuart, M.J. (2012) Tissue factor-positive monocytes in children with sickle cell disease: correlation with biomarkers of haemolysis. *British Journal of Haematology*, **157**, 370-380.
- Setty, B.N., Kulkarni, S., Rao, A.K. & Stuart, M.J. (2000) Fetal hemoglobin in sickle cell disease: relationship to erythrocyte phosphatidylserine exposure and coagulation activation. *Blood*, **96**, 1119-1124.
- Setty, B.N., Rao, A.K. & Stuart, M.J. (2001) Thrombophilia in sickle cell disease: the red cell connection. *Blood*, **98**, 3228-3233.
- Solovey, A., Gui, L., Key, N.S. & Hebbel, R.P. (1998) Tissue factor expression by endothelial cells in sickle cell anemia. *Journal of Clinical Investigation*, **101**, 1899-1904.
- Sparkenbaugh, E. & Pawlinski, R. (2013) Interplay between coagulation and vascular inflammation in sickle cell disease. *British Journal of Haematology*.
- Stuart, M.J. & Nagel, R.L. (2004) Sickle-cell disease. *Lancet*, **364**, 1343-1360.
- Stuart, M.J. & Setty, B.N. (2001) Hemostatic alterations in sickle cell disease: relationships to disease pathophysiology. *Pediatr Pathol Mol Med*, **20**, 27-46.
- Tomer, A. (2004) Platelet activation as a marker for in vivo prothrombotic activity: detection by flow cytometry. *Journal of Biological Regulators and Homeostatic Agents*, **18**, 172-177.
- Tomer, A., Harker, L.A., Kasey, S. & Eckman, J.R. (2001) Thrombogenesis in sickle cell disease. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, **137**, 398-407.

Villagra, J., Shiva, S., Hunter, L.A., Machado, R.F., Gladwin, M.T. & Kato, G.J. (2007) Platelet activation in patients with sickle disease, hemolysis-associated pulmonary hypertension, and nitric oxide scavenging by cell-free hemoglobin. *Blood*, **110**, 2166-2172.

Wun, T., Cordoba, M., Rangaswami, A., Cheung, A.W. & Paglieroni, T. (2002) Activated monocytes and platelet-monocyte aggregates in patients with sickle cell disease. *Clinical and Laboratory Haematology*, **24**, 81-88.

Wun, T., Paglieroni, T., Rangaswami, A., Franklin, P.H., Welborn, J., Cheung, A. & Tablin, F. (1998) Platelet activation in patients with sickle cell disease. *British Journal of Haematology*, **100**, 741-749.

Wun, T., Paglieroni, T., Tablin, F., Welborn, J., Nelson, K. & Cheung, A. (1997) Platelet activation and platelet-erythrocyte aggregates in patients with sickle cell anemia. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, **129**, 507-516.

Wun, T., Soulieres, D., Frelinger, A.L., Krishnamurti, L., Novelli, E.M., Kutlar, A., Ataga, K.I., Knupp, C.L., McMahon, L.E., Strouse, J.J., Zhou, C., Heath, L.E., Nwachuku, C.E., Jakubowski, J.A., Riesmeyer, J.S. & Winters, K.J. (2013) A double-blind, randomized, multicenter phase 2 study of prasugrel versus placebo in adult patients with sickle cell disease. *J Hematol Oncol*, **6**, 17.

## LEGENDS TO FIGURES

**Figure 1.** Platelets as inflammatory cells in SCA. Release of (A) IL-1 $\beta$ , (B) IL-8, (C) platelet factor 4 (PF4) from platelets from healthy control individuals (CON; N  $\geq$  8) and SCA patients in steady state (SCA; N  $\geq$  20). Cytokine release was determined by ELISA in platelet suspensions ( $1 \times 10^8$  PLT/ml) after incubation for 4 h (37°C, 5% CO<sub>2</sub>). Expression of (D) P-selectin and activated  $\alpha_{IIb}\beta_3$  integrin on the surface of platelets from healthy control individuals (CON; N  $\geq$  18) and SCA patients in steady state (SCA; N  $\geq$  27). Adhesion molecule expression was determined by flow cytometry.

**Figure 3.** Surface expressions of (A) ICAM-1 (CD54), (B) E-selectin (CD62E) and (C) VCAM-1 (CD106) adhesion molecules on HUVEC following co-culture in direct contact with healthy control (CON; N  $\geq$  15) PLTs, steady-state sickle cell anemia (SCA; N  $\geq$  25) PLTs or TNF- $\alpha$  (N  $\geq$  11). HUVEC ( $1 \times 10^6$  cells/well) were incubated with CON or SCA PLTs ( $1 \times 10^8$  PLTs/well) in 6-well plates for 4h (37°C, 5% CO<sub>2</sub>), or with TNF- $\alpha$ , (10 ng/ml; 3h incubation, 37°C, 5% CO<sub>2</sub>). Expression of ICAM-1, E-selectin or VCAM-1 was evaluated by flow cytometry using anti-CD54-PE, CD62E-APC and CD106-FITC. \*\*, **p<0.01**; \*\*\*, **p<0.001**, compared to basal (N  $\geq$  16).

**Figure 4.** Surface expressions of (A) ICAM-1 (CD54) and (B) E-selectin (CD62E) adhesion molecules on HUVEC ( $1 \times 10^6$  cells/well) following culture in the presence of healthy control (CON; N  $\geq$  6;  $1 \times 10^8$  PLTs/well) PLTs or steady-state sickle cell anemia (SCA; N  $\geq$  12;  $1 \times 10^8$  PLTs/well) PLTs and in the presence and absence of transwell inserts (0.4  $\mu$ m/pores; 37°C, 5% CO<sub>2</sub>). Expression of ICAM-1 and E-selectin was evaluated by flow cytometry using anti-CD54-PE and CD62E-APC. \*, p<0.01; \*\*, p<0.01; \*\*\*, p<0.001, compared to basal (N  $\geq$  6).

**Figure 5:** Release of IL-8 from co-cultures of HUVEC and PLTs. Levels of IL-8 (ng/ml) were quantified in supernatants of CON and SCA PLTs (4h in suspension, 37°C, 5% CO<sub>2</sub>) by ELISA, and following co-culture of HUVEC ( $1 \times 10^6$  cells/well) in direct contact with CON (n=27) or SCA PLTs ( $1 \times 10^8$  PLTs/well; n=44), (4h, 37°C, 5% CO<sub>2</sub>); or pre-incubation of HUVEC with TNF- $\alpha$  (10 ng/ml; N= 24; 3h, 37°C, 5% CO<sub>2</sub>). \*\*\*, P<0.001, compared to basal (N=24); +++, P<0.001, compared to all groups.

**Figure 6.** Relative gene expression of (A) *ICAM1*, (B) *NFκBIA*, (C) *RELA*, (D) *CHUK* and (E) *IKKB* in HUVEC after co-culture with PLTs. HUVEC ( $1 \times 10^6$  cells/well) were co-cultured in direct contact with CON (N=10) or SCA PLTs (N≥24;  $1 \times 10^8$  PLTs/well) (4h, 37°C, 5% CO<sub>2</sub>); or pre-incubated with HUVEC with TNF-α (10 ng/ml; N≥11; 3h, 37°C, 5% CO<sub>2</sub>). Relative gene expressions were determined by qPCR and expressed relative to *BAC* and *GAPDH* expression. \*, P<0.05; \*\*, P<0.01, compared to basal (N≥11). +++, P<0.001, compared to all groups.

**Figure 7.** Effect of inhibition of the NF-κB pathway on the induction of endothelial adhesion molecule expression by SCA PLTs. The expressions of (A) ICAM-1 (CD54) and (B) E-selectin (CD62E) were determined by flow cytometry on HUVEC ( $1 \times 10^6$  cells/well) following co-culture in direct contact with CON PLTs (N≥13) or SCA PLTs ( $1 \times 10^8$  PLTs/well; N≥14) in the presence or absence of BAY 11-7082 (20 μM; 4h, 37°C, 5% CO<sub>2</sub>). \*, P<0.05; \*\*, P, 0.01, compared to basal (N≥12).

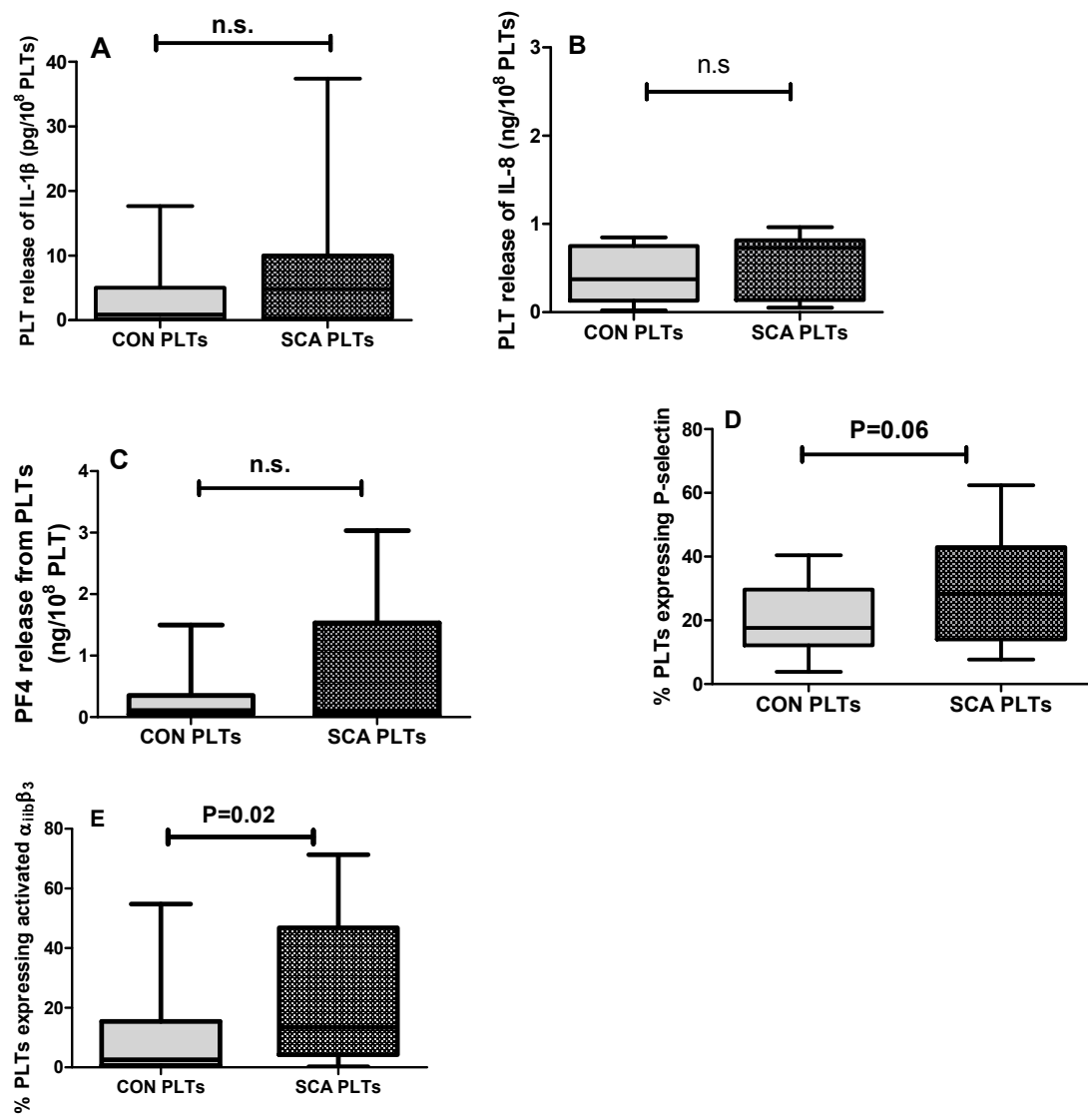


Figure 1.

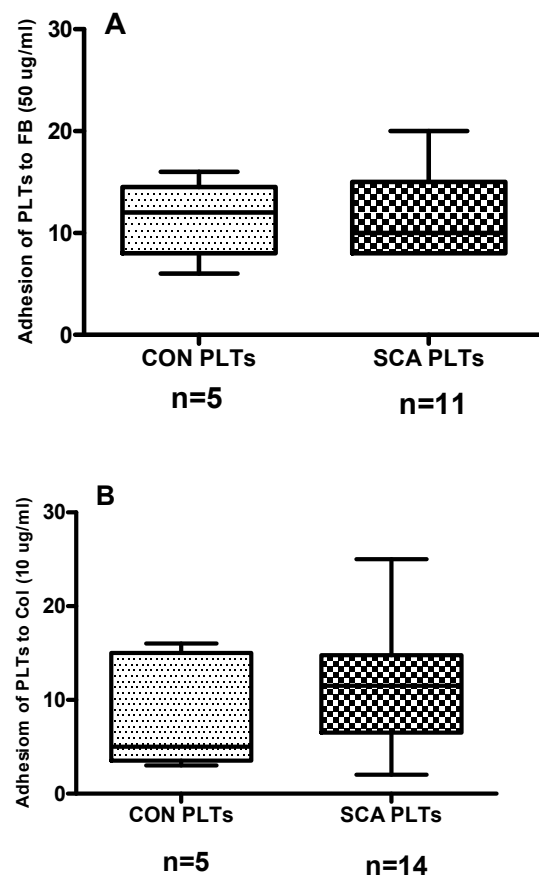


Fig. 2 ADHESION OF PLATELETS

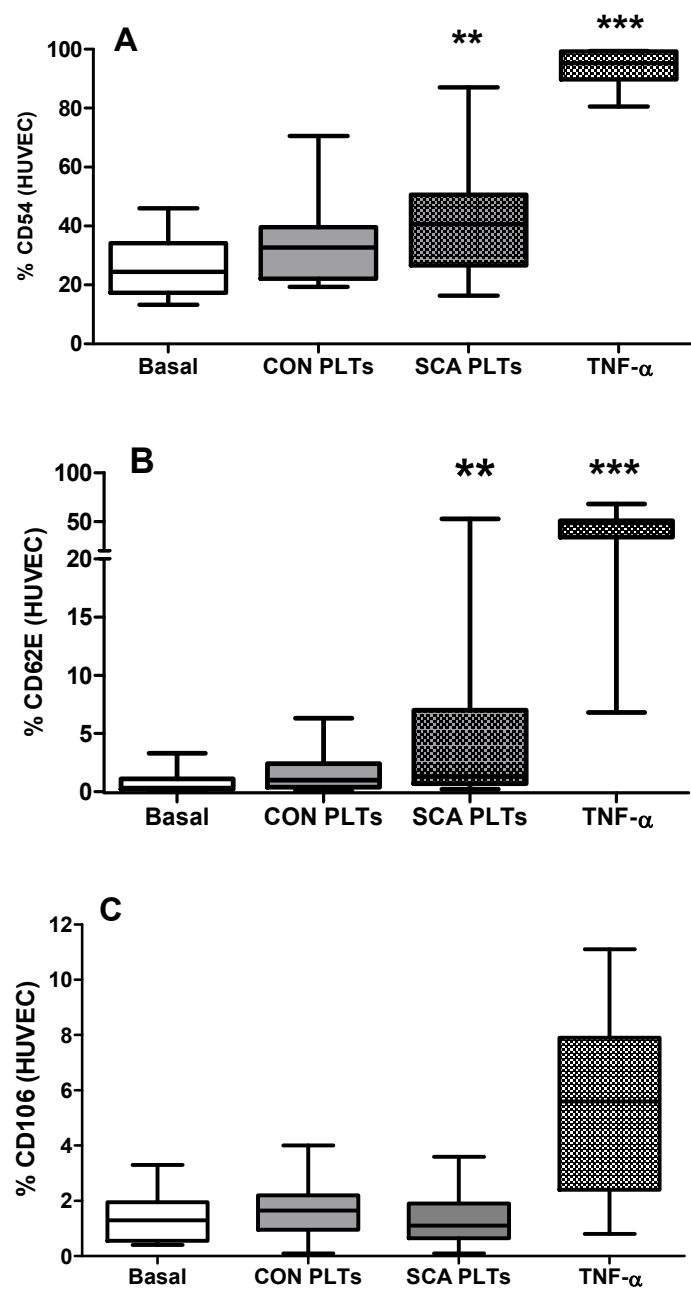


FIG 3. Effect of SCA platelets on Ad mol expression  
Kruskal-Wallis

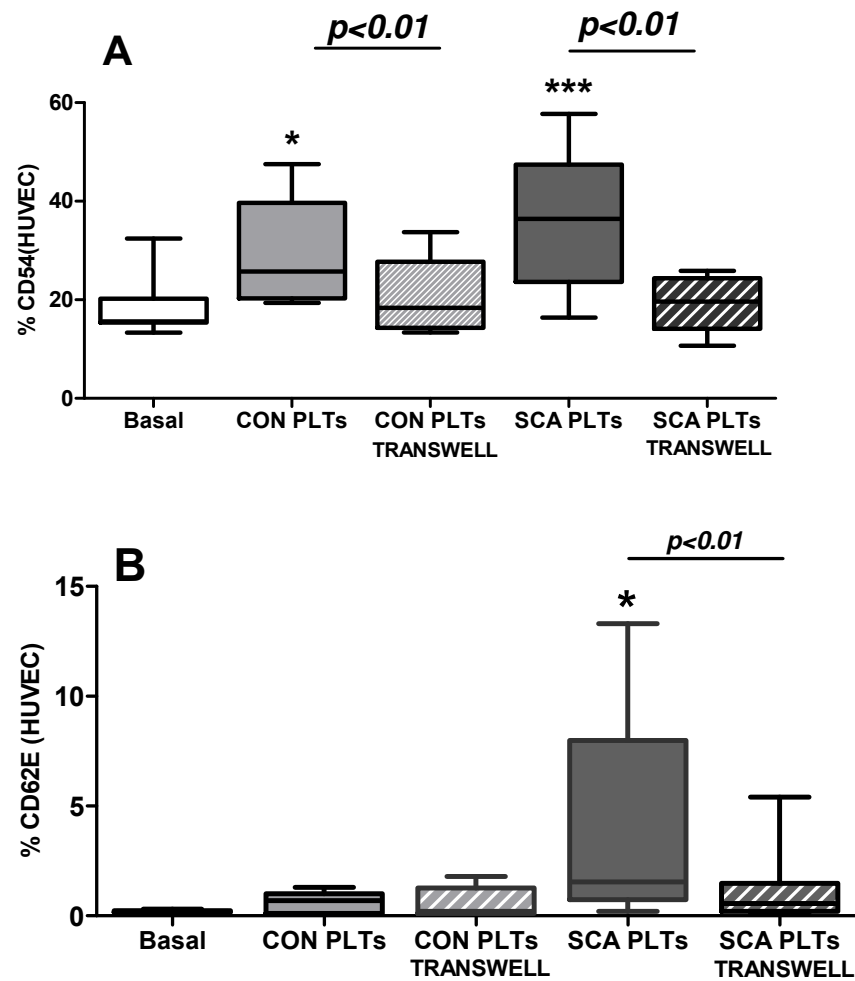


Figure 4: EFFECT of transwell; Kruskal wallis and wilcoxon for with/without transwell

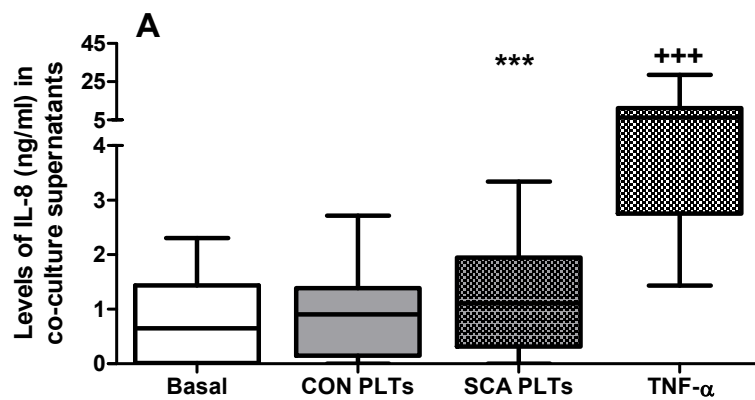


FIGURE 5: effect of PLTs on cytokine production

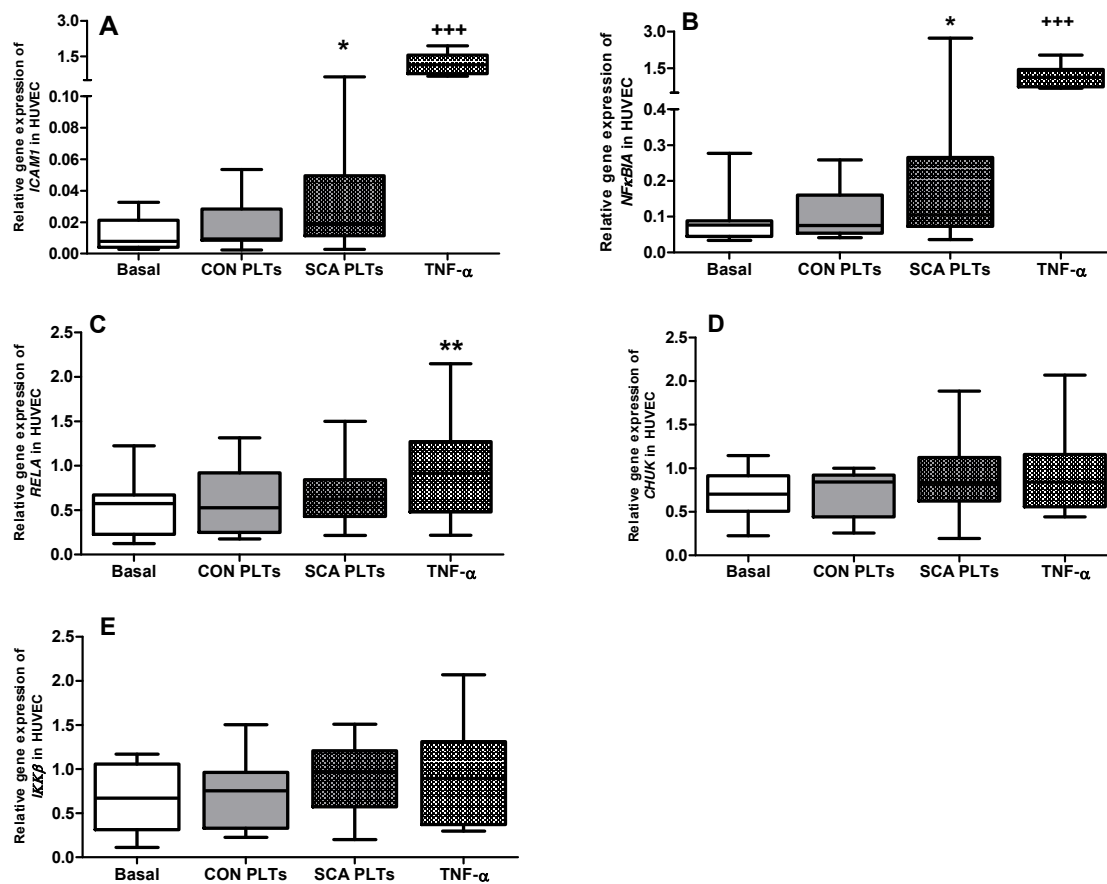


Figure 6: EFFECT OF PLTs on NF $\kappa$ B gene expression

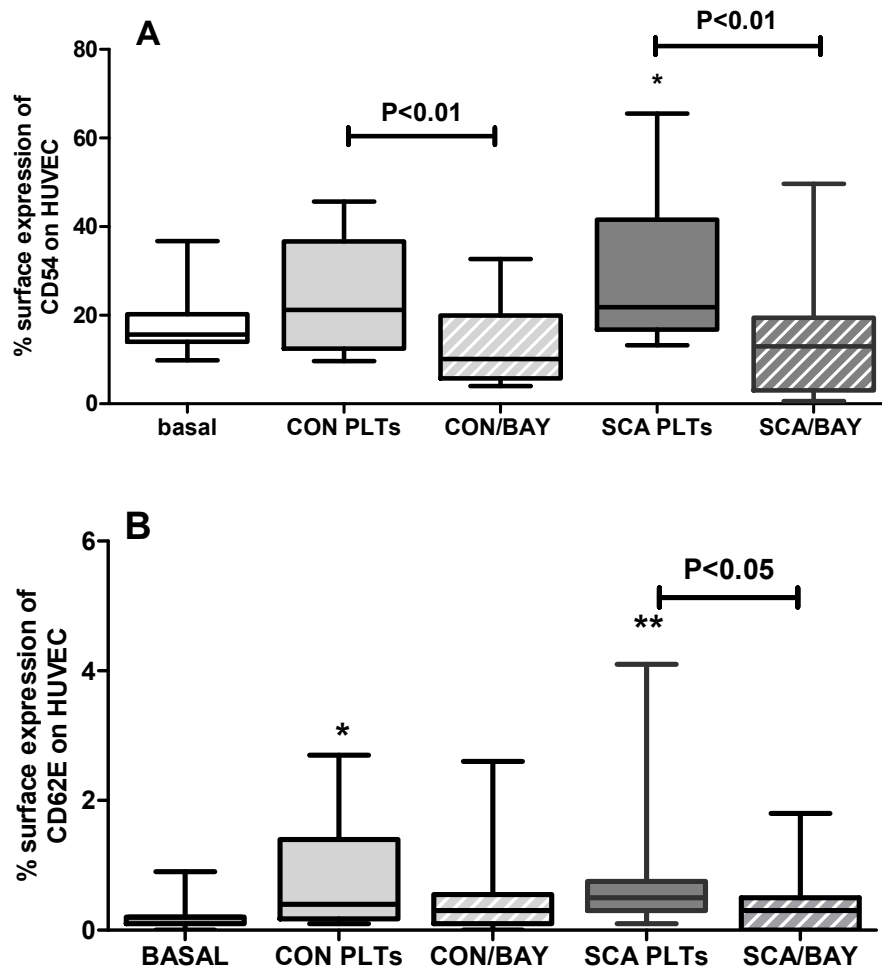


Figure 7: Effect of NFkB inhibition on CD54/CD62E expression with PLTs

**Table I: Clinical and hematological details of all controls and patients participating in the study.**

	<b>CONTROLS</b>	<b>SCD</b>	<b>p</b>
<b>Male/female</b>	18/37	46/44	
<b>Age (years)</b>	34.1 (31; 24, 58)	34.3 (32; 18; 53)	
<b>Hydroxyurea therapy (n)</b>	-	<b>56</b>	
<b>Red blood cells count (<math>10^6/\mu\text{L}</math>)</b>	4.70 (4.64; 3.79; 5.60)	<b>2.61</b> (2.61; 1.63; 4.78)	<b>p&lt;0.001</b>
<b>Hematocrit (%)</b>	39.9 (39.5; 32.1; 48.4)	<b>24.8</b> (22.6; 17.; 37.4)	<b>p&lt;0.001</b>
<b>Hemoglobin (g/dL)</b>	13.5 (13.3; 10.9; 15.6)	<b>8.5</b> (8.0; 6.0; 12.9)	<b>p&lt;0.001</b>
<b>Mean corpuscular volume (fL)</b>	84.6 (84.3; 74.9; 95.7)	<b>96.1</b> (93.8; 69.2; 126.6)	<b>p&lt;0.001</b>
<b>Mean corpuscular hemoglobin (pg)</b>	28.8 (29.0; 25.2; 30.8)	<b>33.4</b> (33.1; 20.9; 47.0)	<b>p&lt;0.01</b>
<b>WBC (<math>10^3/\mu\text{L}</math>)</b>	6.1 (5.90; 3.6; 8.9)	<b>9.6</b> (9.5; 4.0; 22.3)	<b>p&lt;0.001</b>
<b>HbF (%)</b>	0.4 (0.3; 0.1; 1.7)	<b>10.6</b> (8.7; 0.8; 27.2)	<b>p&lt;0.001</b>
<b>PLT (<math>10^3/\mu\text{L}</math>)</b>	293 (276; 208; 428)	<b>375</b> (355; 156; 711)	<b>p&lt;0.01</b>

SCD, steady-state SCD patients; hydroxyurea therapy (20-30 mg/kg/day for at least 3 months); HbF, fetal hemoglobin. Data present (except M/F value) are mean (median, min, max).

**Table II: Primer sequences for performance of real-time quantitative PCR**

<b>Genes</b>	<b>Primers</b>	<b>Optimal concentration (nM)</b>
<i>ICAM1</i> - F	5'-GGAAATACTGAACTTGCTGCCTAT-3'	150
<i>ICAM1</i> - R	5'-ACACATGTCTATGGAGGGCCAC-3'	
<i>NFκBIA</i> - F	5'-GCTTTTGGTGTCTTGGGT-3'	70
<i>NFκBIA</i> - R	5'-AGGTCCACTGCGAGGTGA-3'	
<i>RelA</i> - F	5'-CACCTCGACGCATTGCTGT-3'	70
<i>RelA</i> - R	5'-GACGTAAAGGGATAGGGCTGG-3'	
<i>CHUK</i> - F	5'-ACCAGCATCGGGAAGTTGATC-3'	70
<i>CHUK</i> - R	5'-TGGCACCATCGTTCTCTGTTT-3'	
<i>IKKβ</i> - F	5'-ATCTCCGGAAGTACCTGAACCA-3'	70
<i>IKKβ</i> - R	5'-AGCGCAGAGGCAATGTCACT-3'	
<i>Beta-actin</i> - F	5'-AAAGAGATGGCCACGGCTGCT-3'	150
<i>Beta-actin</i> - R	5'-TCGCTCCAACCGACTGCTGT-3'	
<i>GAPDH</i> - F	5'-GCACCGTCAAGGCTGAGAAC-3'	150
<i>GAPDH</i> - R	5'-CCACTTGATTTTGGAGGGATCT-3'	

## 10.2- Apêndice II: Artigo publicado em 5 de fevereiro de 2010.

**bjh** research paper

### Increased adhesive properties of platelets in sickle cell disease: roles for $\alpha_{IIb}\beta_3$ -mediated ligand binding, diminished cAMP signalling and increased phosphodiesterase 3A activity

Renata Proença-Ferreira, Carla F. Franco-Penteado, Fabiola Traina, Sara T. O. Saad, Fernando F. Costa and Nicola Conran

The Haematology and Haemotherapy Centre, School of Medicine, University of Campinas – UNICAMP, Brazil

#### Summary

Whilst high pro-coagulant activity is reported in sickle cell disease (SCD), the precise role of platelets (PLTs) in SCD inflammatory and vaso-occlusive processes is unclear. Adhesion of PLTs from healthy controls (CON), SCD individuals (SCD) and SCD patients on hydroxycarbamide (SCDHC) to fibrinogen (FB) was compared using static adhesion assays. PLT adhesion molecules and intraplatelet cyclic adenosine monophosphate (icAMP) were observed by flow cytometry and enzyme-linked immunosorbent assay. SCD-PLTs demonstrated significantly greater adhesion than CON-PLTs to FB. Participation of the  $\alpha_{IIb}\beta_3$ -integrin in SCD-PLT adhesion was implicated by increased  $\alpha_{IIb}\beta_3$  activation and data showing that an  $\alpha_{IIb}\beta_3$ -function-inhibiting antibody significantly diminished SCD-PLT adhesion to FB. Platelet activation was potentiated by reductions in icAMP; cAMP levels were decreased in SCD-PLTs, being comparable to those of thrombin-stimulated CON-PLTs. Furthermore, SCD-PLT adhesion to FB was significantly reduced by cilostazol, an inhibitor of cAMP-hydrolyzing phosphodiesterase 3A (PDE3A). Both  $\alpha_{IIb}\beta_3$ -integrin activation and icAMP correlated significantly with fetal haemoglobin in SCD. Accordingly, hydroxycarbamide therapy was associated with lower PLT adhesion and higher icAMP. SCD-PLTs may be capable of adhering to proteins encountered on the inflamed vascular wall and, potentially, participate in vaso-occlusive processes. Hydroxycarbamide and, speculatively, nitric oxide donor or cyclic-nucleotide-targeted therapies may aid in the reversal of PLT adhesive properties in SCD.

**Keywords:** adhesion, cyclic nucleotides, sickle cell disease, platelets, vaso-occlusion.

Received 2 December 2009; accepted for publication 27 December 2009  
Correspondence: Nicola Conran, Ph.D., Hemocentro, Rua Carlos Chagas, 480, Cidade Universitária, Barão Geraldo, Campinas 13083-970-SP, Brazil. E-mail: conran@unicamp.br

The precise role of platelets in sickle cell disease (SCD) inflammatory and vaso-occlusive processes is not yet well characterized. Significant procoagulant activity in SCD pathophysiology is indicated by evidence that platelets circulate in an activated state in SCD individuals, where they express elevated surface P-selectin and activated  $\alpha_{IIb}\beta_3$  (GPIIb/IIIa) and produce higher concentrations of platelet activation markers, such as platelet factor 4 (PF4) and  $\beta$  thromboglobulin (Westwick *et al*, 1983; Papadimitriou *et al*, 1993; Tomer *et al*, 2001). *In vitro* studies demonstrate interactions of platelets from SCD individuals with both monocytes and red blood cells, indicating their participation in the formation of the

heterotypic cellular aggregates (Wun *et al*, 1999; Brittain *et al*, 2008) that are thought to participate in vaso-occlusion. In mouse models of SCD, platelet adhesion to the endothelial cells of cerebral venules of transgenic mice has been reported (Wood *et al*, 2004) and the capture of platelets by adherent polarized neutrophils in the inflamed venules of a mouse model of acute lung injury was suggested to produce vascular damage via the generation of reactive oxygen species (Hidalgo *et al*, 2009).

It is likely that the close proximity of activated platelets with the vessel wall, either via a direct interaction or via heterocellular aggregate formation, may contribute to the vaso-occlusive

First published online 5 February 2010  
doi:10.1111/j.1365-2141.2010.08087.x

© 2010 Blackwell Publishing Ltd, *British Journal of Haematology*, 149, 280–288

**bjh** british journal of haematology

process. The milieu of inflammatory mediators that may be released by activated platelets at sites of vaso-occlusion include potent activators of endothelial activation, such as soluble CD40 ligand (sCD40L) (Lee *et al.*, 2006), PF4 and interleukin-1 $\beta$  (van Gils *et al.*, 2009), which may aid in the perpetuation of the inflammatory state and activation of endothelium in SCD. Furthermore, there is evidence that activated platelets, when adhered to the endothelial wall, may permit the recruitment of leucocytes to immobilized platelets (Wagner & Frenette, 2008).

We, herein, investigated the capacity of human SCD platelets to adhere to a protein commonly encountered on inflamed endothelium, as well as to collagen, a protein of the sub-endothelium that is exposed at sites of vascular injury. For this, adhesive properties of platelets from SCD individuals and from healthy control individuals were compared. Alterations in surface adhesion protein expression and signalling pathways in these cell fragments were also investigated.

## Patients and methods

### Materials

Human fibrinogen was purchased from Calbiochem (La Jolla, CA, USA); cilostazol, vinpocetine, collagen type I and human thrombin (TB) were bought from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).

### Patients

Steady-state patients, diagnosed as homozygous for HbS (using haemoglobin electrophoresis methods and high performance liquid chromatography), participated in the study. All patients attended regular clinics at the Haematology and Haemotherapy Centre, UNICAMP, had not experienced painful crisis nor received blood transfusions in the preceding 3 months and had

not taken aspirin during the previous 10 days. Patients on hydroxycarbamide (HC) therapy had been taking 20–30 mg/kg per d for at least 3 months. Healthy volunteers who had not taken any medication within the last 10 d were used as controls and age- and gender-matched, as appropriate. See Table I for clinical details of participating patients and healthy controls. Informed written consent was obtained from all patients and controls and the study was approved by the ethics committee of the University of Campinas.

### Preparation of washed platelets

Platelet rich plasma (PRP) was obtained by centrifugation of whole blood (collected in EDTA or sodium citrate) at 200 g at 20°C for 15 min. PRP was washed once in wash buffer (140 mmol/l NaCl, 5.0 mmol/l KCl, 12 mmol/l sodium citrate, 10 mmol/l glucose and 12.5 mmol/l saccharose, pH 6) and platelets were isolated from the PRP by centrifugation at 800 g at 20°C for 12 min. The platelet pellet was resuspended in O<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> gassed Krebs solution (118 mmol/l NaCl, 25 mmol/l NaHCO<sub>3</sub>, 1.2 mmol/l KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1.7 mmol/l MgSO<sub>4</sub>, 5.6 mmol/l glucose, pH 7.4). Platelet counts were performed using a Cell Dyn apparatus (Cell-Dyn® 1600; Mountain View, CA, USA) and adjusted to a concentration of  $1 \times 10^8$  platelets/ml in Krebs buffer in the presence of 1 mmol/l CaCl<sub>2</sub>. Suspensions were utilized immediately in assays and the anticoagulant utilized did not affect assay results. Control and SCD platelets were treated in the same manner and always run in parallel in platelet assays; thus, differences in properties of platelets reflect differences inherent to these platelets, and are not due to the separation/washing procedure.

### In vitro platelet adhesion assay

The static platelet adhesion assay employed was based on a previously reported method (Bellavite *et al.*, 1994). Ninety-

Table I. Clinical details of all controls and patients participating in the study.

	Controls	SCD	SCDHC	P SCD comp. SCDHC
Male/female	20/29	11/25	16/15	
Age (years)	33 (32.5; 19, 52)	39.8 (39, 20, 65)	36.4 (34, 22, 66)	>0.05
Red blood cells count ( $10^{12}/l$ )	N/D	2.71 (2.66, 1.75, 4.48)	2.67 (2.67, 1.59, 3.53)	>0.05
Haematocrit (%)	44 (45, 38, 50)	24.0 (24.4, 17.5, 33.6)	27.1 (27.3, 16.3, 37.4)	0.005
Haemoglobin (g/l)	N/D	79.5 (80, 56, 106)	91.5 (90, 55, 141)	0.003
Mean corpuscular volume (fl)	N/D	89.5 (91.3, 73.9, 105.1)	102.9 (105.0, 78.9, 120.8)	<0.001
Mean corpuscular haemoglobin (pg)	N/D	29.69 (30.17, 22.1, 35.6)	34.8 (35.0, 24.9, 41.7)	<0.0001
White blood cell count ( $\times 10^9/l$ )	N/D	9.9 (9.7, 4.6, 18.2)	7.9 (7.6, 3.6, 15.8)	0.005
Platelet count ( $\times 10^9/l$ )	N/D	470.74 (477.5, 190.5, 1325)	423.1 (382.3, 202, 730)	>0.05
HbF (%)	N/D	8.1 (6.2, 0.5, 19.5)	16.3 (17.6, 2.1, 27.0)	<0.00001

SCD, steady-state SCD patients not taking hydroxycarbamide; SCDHC, steady-state SCD patients on hydroxycarbamide therapy (20–30 mg/kg per d for at least 3 months); HbF, fetal haemoglobin; N/D, not determined.

Data presented (except M/F value) are mean (median, min, max).

six-well microtitre plates were coated with 50 µg/ml fibrinogen or 10 µg/ml human collagen type I (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) and incubated overnight at 4°C. Non-specific sites were blocked afterwards with 1% bovine serum albumin/Krebs solution for 60 min at 37°C and plates were washed twice and dried. Optimal concentrations of ligands used to coat microplates were established previously in preliminary assays (data not shown). Platelet suspensions (50 µl of  $1 \times 10^8$  platelets/ml) were added to each well and left to adhere for 15 min at 37°C. Non-adherent platelets were removed (gentle washing with Krebs solution) and remaining adherent platelets were quantified by the measurement of platelet acid phosphatase. Wells containing adherent platelets were incubated with acid phosphatase substrate solution (0.1 mol/l citrate buffer, pH 5.4, containing 5 mmol/l *p*-nitrophenyl phosphate and 0.1% Triton X-100) for 1 h at room temperature (RT). The reaction was stopped by the addition of 2 mol/l NaOH and *p*-nitrophenol production was determined with a microplate reader at 405 nm. The percentage of adherent cells was calculated by comparing acid phosphatase activity to that of a standard curve with known numbers of platelets from the same individual. Platelet acid phosphatase activity is not affected by the functional state of the cell nor by agonist stimulation (Bellavite *et al*, 1994). All experiments were performed in triplicate. Co-incubation of platelets with thrombin (50 mU/ml) was used to stimulate adhesion in some assays; as conditions that restrict platelet aggregation were utilized (absence of flow/stirring, presence of  $Mg^{2+}$ ) (Eriksson & Whiss, 2009), minimal platelet aggregation and disposition were observed (microscopic observations) and, thus, platelets quantified were deemed to be adhered platelets and not aggregated platelets. In assays in which pharmacological inhibitors were utilized, platelets were pre-incubated for 15 min (37°C) with inhibitors before adding to ligand-coated wells. Cilostazol was solubilised in dimethyl sulphoxide (DMSO) and a maximum final concentration of 0.01% v/v DMSO was utilized in assays. Adhesion in the presence of cilostazol was compared to basal platelet adhesion in the presence of an equivalent concentration of DMSO vehicle. Vinpocetine was solubilised in ethanol (final concentration; 0.25% v/v) and the adhesion data reported compare platelet adhesion in the presence of vinpocetine to platelet adhesion in the presence of equivalent ethanol vehicle.

#### Flow cytometry

The following antibodies were used to detect surface platelet adhesion molecules: fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated anti-CD62P (anti-P-selectin; clone AK-4); phycoerythrin (PE)-conjugated anti-CD42b PE (anti-GP Ib; clone HIP1); FITC-conjugated anti-CD49b (anti- $\alpha_2$  integrin subunit; clone AK-7), FITC-conjugated anti-CD41a (anti- $\alpha_{IIb}$  integrin subunit; clone HIP8) (all purchased from Becton Dickinson, San Jose, CA, USA). The FITC-PAC-1 antibody (Becton

Dickinson) was utilized to recognize the  $\alpha_{IIb}\beta_3$  integrin in its active high-affinity conformation. Unwashed PRP (5 µl) was separated from whole blood (collected in sodium citrate) and immediately fixed with 1% paraformaldehyde (200 µl, 10 min, RT). Platelets were then washed with phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.4) and resuspended ( $1 \times 10^8$  platelets/ml) before incubating with the antibody of choice (20 min, 4°C, RT, dark). Samples were then washed once again in PBS and platelet fluorescence (10 000 events) was analyzed at 488 nm utilizing a FACScalibur (Becton Dickinson). SSC/FSC (side scatter/forward scatter) dot plots were used to gate the platelet population and FITC/PE matched-isotype controls were used as labelling controls.

#### Extraction and quantification of intraplatelet cAMP and cGMP

Platelets suspended in Krebs ( $1 \times 10^8$  platelet/ml) were incubated with 2 mmol/l 3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX; Calbiochem, San Diego, CA, USA) for 15 min at RT. Suspensions were then stimulated, or not, with 50 mU/ml TB for 15 min at 37°C before extracting cyclic nucleotides by adding perchloric acid to platelet suspensions to a final concentration of 0.5 mol/l. The samples were then centrifuged at 6000 g for 20 min and supernatants were removed and retained and the pH neutralized by the addition of 8 mol/l KOH. Samples were stored at -80°C and assayed for cAMP or cGMP using commercially available enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kits (Amersham International, Bucks, UK), and following the manufacturer's instructions.

#### Statistical analysis

Data are reported as the mean and standard error of the mean (SEM) of *n* subjects. Data for different patient groups were compared by non-parametric analysis of variance (ANOVA) followed by Dunn's Multiple Comparisons test. Effects of treatment were compared by the Wilcoxon's matched pairs test or repeated measures ANOVA (non-parametric) followed by Dunn's Multiple Comparisons test. Correlations were analyzed using the Spearman's test. Differences were considered to be significant when  $P < 0.05$ .

## Results

#### SCD platelets demonstrate an increased ability to adhere to fibrinogen, but not to collagen, *in vitro*

Under *in vitro* conditions, platelets from steady-state SCD individuals (SCD PLTs) demonstrated a significantly greater adhesion to fibrinogen (FB, 50 µg/ml) than control platelets (CON PLTs). In contrast, adhesion of platelets from SCD patients on HC therapy (SCDHC PLTs) was significantly lower than that of SCD PLTs, being similar to that of CON PLTs (Fig 1A). TB stimulation (50 mU/ml, co-incubation)

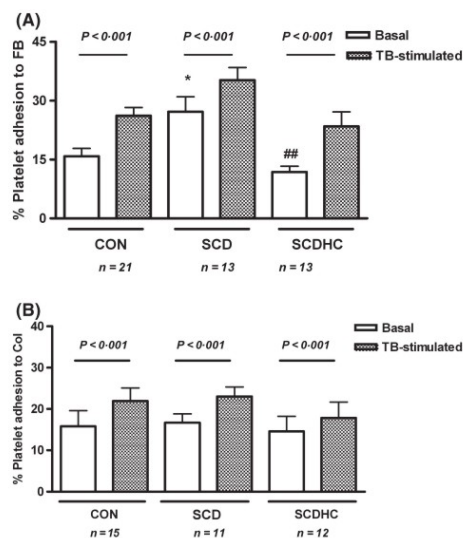


Fig 1. Adhesion properties of platelets from healthy control and SCD individuals. Platelets from control individuals (CON), steady-state SCD individuals (SCD) and SCD patients on hydroxycarbamide therapy (SCDHC) were allowed to adhere, *in vitro* (37°C, 15 min), to (A) fibrinogen (FB, 50 µg/ml), in the absence or presence of thrombin stimulus (TB; 50 mU/ml); (B) collagen (Col, 10 µg/ml) in the absence or presence of TB stimulus (50 mU/ml). Platelet adhesion is expressed as the mean percentage of platelets adhered  $\pm$  SEM. \* $P < 0.05$  compared to CON; ## $P < 0.01$  compared to SCD.

significantly increased CON, SCD and SCDHC PLT adhesion to FB to a similar extent (Fig 1A).

In contrast, basal and TB-stimulated (50 mU/ml) adhesion of SCD PLT to collagen (Col, 10 µg/ml) was not significantly different for CON, SCD and SCDHC PLTs (Fig 1B), indicating that FB-specific, but not Col-specific, adhesive mechanisms are augmented in SCD PLTs.

#### Activated $\alpha_{IIb}\beta_3$ integrin may contribute to increased platelet adhesive properties in SCD

Flow cytometry was utilized to compare the surface expressions of CD42b (GPIb), CD62P (P-selectin), CD49b ( $\alpha_2$  subunit of the collagen receptor integrin,  $\alpha_2\beta_1$ ) and CD41a ( $\alpha_{IIb}$ ) on platelets from healthy control individuals and patients receiving HC therapy, or not (Table II). In addition,  $\alpha_{IIb}\beta_3$ -integrin activation was compared using the PAC-1 antibody that binds to an epitope on activated platelet  $\alpha_{IIb}\beta_3$  (Table II). As observed in other studies (Villagra *et al.*, 2007), P-selectin expression and presentation of activated  $\alpha_{IIb}\beta_3$  was significantly increased on the surface of SCD PLTs, compared to healthy CON PLTs. In contrast, P-selectin and activated  $\alpha_{IIb}\beta_3$  expression was not significantly increased on SCDHC PLTs. Importantly, correlation of activated platelet  $\alpha_{IIb}\beta_3$  expression to levels of fetal haemoglobin (% HbF) presented by patients revealed a significant negative correlation (Spearman  $r = -0.626$ ,  $P < 0.001$ ,  $n = 25$ ; SCD and SCDHC patients). In contrast, activated  $\alpha_{IIb}\beta_3$  did not correlate with levels of serum lactate dehydrogenase (LDH) in SCD, and expression of platelet P-selectin demonstrated no significant correlation with either % HbF or LDH.

The ability of platelets to adhere to FB-coated plates in the presence or absence of anti-CD62P antibody or the PAC-1 antibody was determined. PAC-1 antibody, but not anti-CD62P antibody, significantly diminished non-TB-stimulated SCD platelet adhesion to FB (Fig 2). PAC-1 also significantly inhibited TB-stimulated adhesion of CON, SCD and SCDHC PLTs to FB (Fig 2). Antibodies specific for the  $\alpha_2$ -integrin subunit, for the unactivated  $\alpha_{IIb}$  (CD41) and the GPIb protein (CD42b) had no significant effect upon platelet adhesion (non-stimulated and TB-stimulated) to FB ( $P > 0.05$ , data not shown).

#### Intracellular cAMP is decreased in SCD platelets

Reductions in intracellular cyclic adenosine monophosphate (cAMP) are known to potentate platelet activation. Levels of cAMP were found to be significantly decreased in SCD PLTs,

Table II. Surface expression and activation of adhesion molecules on platelets.

Adhesion Molecule	CON ( $n \geq 18$ )		SCD ( $n \geq 16$ )		SCDHC ( $n \geq 12$ )	
	% positive	MFI	% positive	MFI	% positive	MFI
CD42b	97.5 (96.1–99.3)	755.5 (535.1–962.7)	98.6 (97.7–99.3)	754.5 (536.6–889.1)	98.34 (95.7–99.0)	746.7 (642.5–915.6)
CD62P	17.6 (12.2–29.6)	11.2 (9.9–15.3)*	29.7 (13.9–41.5)	25.2 (9.8–42.1)*	25.2 (9.8–42.1)	17.6 (10.2–24.5)
CD49b	74.5 (57.2–87.7)	24.5 (19.3–34.4)	74.5 (50.9–91.4)	28.7 (19.4–38.2)	71.8 (48.4–85.0)	27.6 (21.9–33.0)
CD41a	98.1 (96.4–99.4)	368.2 (279.5–535.7)	98.8 (97.8–99.3)	346.0 (276.5–536.6)	98.5 (95.3–99.2)	446.0 (298.6–586.7)
Activated $\alpha_{IIb}\beta_3$	2.6 (0.6–15.5)#	6.4 (3.4–11.0)	20.7 (3.1–57.3)# <sup>c</sup>	12.5 (4.8–26.0)	5.3 (0.3–11.4) <sup>c</sup>	6.5 (4.1–8.2)

Data expressed as median values with interquartile ranges for percentage of platelets binding antibody (% positive) and Mean Fluorescence Intensity (MFI) of antibody binding on each platelet. Platelet surface expressions of CD42b (GPIb), CD62P (P-selectin), CD49b ( $\alpha_2$  subunit of  $\alpha_2\beta_1$ ) and CD41a ( $\alpha_{IIb}$ ) were determined by flow cytometry. Control individuals (CON), steady-state patients (SCD) and patients on hydroxycarbamide therapy (SCDHC). Expression of the  $\alpha_{IIb}\beta_3$  integrin in its activated formation was determined by binding of the PAC-1 antibody. Matching symbols denote those values that were statistically significant different ( $P < 0.05$ ; Mann–Whitney test).

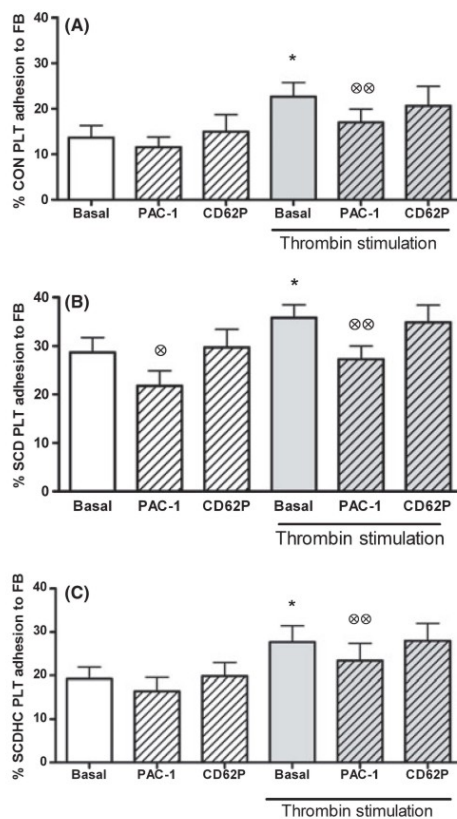


Fig 2. Effect of adhesion molecule-specific antibodies on platelet adhesion to fibrinogen. Platelets from (A) healthy control individuals ( $n = 9$ ); (B) steady-state SCD individuals ( $n = 7$ ) and (C) SCD patients on hydroxycarbamide therapy ( $n = 8$ ) were allowed to adhere to FB (50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) in the presence, or absence of, monoclonal antibodies specific for the P-selectin molecule (anti-CD62P) or the activated-integrin  $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$  antibody, PAC-1, and in the presence, or absence, of a TB stimulus (50  $\text{mU}/\text{ml}$ , 37°C, 15 min). Platelet adhesion is expressed as the mean percentage of platelets adhered  $\pm$  SEM. \* $P < 0.05$ , compared to non-TB-stimulated;  $\otimes P < 0.05$ , compared to basal;  $\otimes\otimes P < 0.01$ , compared to basal.

compared to CON and SCDHC PLTs (Fig 3A). Thrombin stimulation is known to considerably reduce intracellular cAMP concentrations upon platelet activation (Zhang & Colman, 2007). Accordingly, CON and SCDHC PLT cAMP levels were significantly decreased following TB stimulation (50  $\text{mU}/\text{ml}$ ) to levels comparable to those of SCD PLTs (Fig 3B). Whilst TB further diminished SCD PLT cAMP levels, this reduction was not statistically significant. Notably, intracellular cAMP significantly correlated with levels of HbF in SCD individuals ( $n = 13$ ,  $r = 0.610$ ,  $P = 0.02$ , Spearman's

correlation) and in SCD and SCDHC individuals when observed as a group (Fig 3C). In contrast, platelet cAMP did not correlate with levels of LDH when either the SCD group alone or the SCD and SCDHC groups together were analyzed ( $P > 0.05$ ).

#### Intracellular cGMP is not altered in SCD platelets

Levels of the other cyclic nucleotide second messenger, cyclic guanosine monophosphate (cGMP), were not found to be significantly different in CON and SCD PLTs. A slight, but non-significant increase in cGMP was observed in SCDHC PLTs (Fig 3D).

#### Inhibition of phosphodiesterase 3A (PDE3A) activity diminishes SCD platelet adhesive properties

Thrombin has been reported to regulate intracellular cAMP in human platelets by activating PDE3A and enabling it to hydrolyze cAMP. Since intraplatelet cAMP was found to be significantly reduced in SCD PLTs, we determined whether inhibition of PDE3A activity, using the PDE3A-specific pharmacological inhibitor, cilostazol (0.66  $\mu\text{mol}/\text{l}$ –10  $\mu\text{mol}/\text{l}$ ), could affect SCD PLT adhesive properties. Co-incubation of platelets with cilostazol (1.7  $\mu\text{mol}/\text{l}$ ) significantly diminished the adhesion only of SCD PLTs to FB, when compared with DMSO vehicle-treated platelets (Fig 4). In contrast, when platelets were stimulated with TB, cilostazol significantly inhibited the adhesion of all platelets to FB when compared with DMSO vehicle-treated platelets.

Conversely, the PDE1 inhibitor, vinpocetine (50  $\mu\text{mol}/\text{l}$ ), did not significantly alter CON or SCD platelet adhesion to FB (CON PLTs: basal adhesion,  $20.4 \pm 2.9\%$  adhesion; 50  $\mu\text{mol}/\text{l}$  vinpocetine,  $21.5 \pm 4.1\%$ ,  $n = 3$ ,  $P > 0.05$ ; SCD PLTs: basal adhesion,  $27.4 \pm 4.1\%$ ; 50  $\mu\text{mol}/\text{l}$  vinpocetine,  $25.2 \pm 6.3\%$ ,  $n = 4$ ,  $P > 0.05$ ).

## Discussion

The function of blood platelets is to arrest bleeding by the formation of stable blood clots, following activation of the coagulation cascade. Platelets also contribute to the integrity of the endothelium and take part in inflammatory processes (van Gils *et al*, 2009). Previous studies have reported interactions of SCD platelets with monocytes and red blood cells (Wun *et al*, 1999, 2002; Brittain *et al*, 2008); we, herein, present data to indicate that platelets from SCD individuals demonstrate an increased ability to bind to immobilized fibrinogen.

During inflammatory conditions, platelets roll along and adhere to activated endothelium; where their firm adhesion is mediated by P-selectin and the interaction of activated platelet  $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$  with FB. FB molecules are, in turn, anchored to the intracellular adhesion molecule-1 and  $\alpha_v\beta_3$  proteins expressed by activated endothelium (Tabuchi & Kuebler, 2008; Wagner & Frenette, 2008). Inflammatory processes contribute to

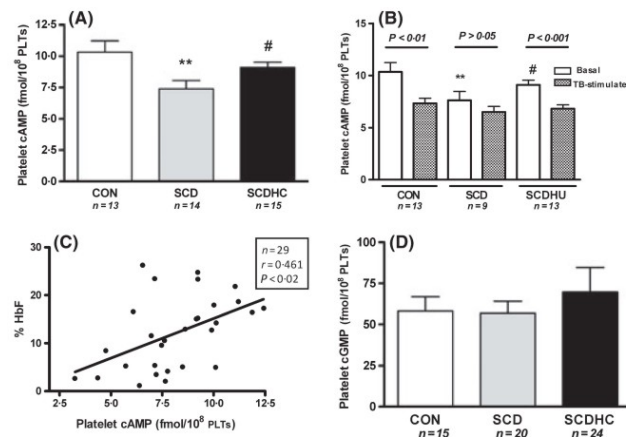


Fig 3. Intraplatelet cyclic nucleotide levels. Cyclic nucleotides were extracted from the platelets of control individuals (CON), steady-state SCD individuals (SCD) and SCD patients on hydroxycarbamide therapy (SCDHC) and quantified by ELISA. (A) Basal intraplatelet cAMP levels; (B) intraplatelet cAMP in the absence or presence of TB stimulation (50 mU/ml; 37°C, 15 min); (C) Significant correlation of cAMP of SCD and SCDHC platelets with individuals' HbF levels, Spearman's correlation; (D) basal intraplatelet cGMP. \*\* $P < 0.01$ , compared to CON; # $P < 0.05$ , compared to SCD.

endothelial activation in the vessels of SCD individuals (Conran & Costa, 2009) and, as such, it is probable that FB is presented on the vessel endothelial surface. Conditions of low shear, or even interrupted flow are believed to probably occur in the microvasculature during vaso-occlusive processes (Rodgers *et al*, 1984; Montes *et al*, 2002). For this reason, static adhesion assays that focus on the low affinity adhesive interactions that probably come into play under conditions of low shear stress were utilized in the present study.

In contrast to an increased ability to adhere to FB under static conditions, SCD platelets did not demonstrate any alteration in their capacity to adhere to collagen, suggesting that activation of the FB receptor,  $\alpha_{IIb}\beta_3$ , may mediate the increased adhesive properties observed. Flow cytometric analysis demonstrated that SCD platelets present augmented integrin  $\alpha_{IIb}\beta_3$  activation, as previously reported (Villagra *et al*, 2007), and inhibition of activated  $\alpha_{IIb}\beta_3$  function by co-incubation with PAC-1 significantly decreased the adhesion of SCD platelets to FB. Stimulation with TB also increased control platelet adhesion to FB and further increased SCD platelet adhesion to FB; in turn, inhibition of activated  $\alpha_{IIb}\beta_3$  function also significantly diminished TB-induced platelet adhesion to FB. Data indicate that whilst SCD platelets appear to circulate in an activated state they may still be responsive to physiological stimuli, and are capable of further augmenting their adhesive interactions, apparently via further activation of the  $\alpha_{IIb}\beta_3$  integrin.

P-selectin expression was also significantly increased on the surface of SCD platelets, in accordance with previous observations (Villagra *et al*, 2007). Involvement of P-selectin in the

adhesion of SCD platelets to FB appears unlikely, although it is possible that the increased expression of this adhesion molecule may permit the adhesion of platelets to other endothelial ligands, such as P-selectin glycoprotein ligand 1 (PSGL-1) and GPIb. Future studies will investigate such a possibility. Activated  $\alpha_{IIb}\beta_3$  expression has been previously correlated to the severity of pulmonary hypertension in SCD and also to laboratory markers of haemolysis, such as reticulocyte count (Villagra *et al*, 2007). In the current study, whilst no correlation of activated SCD platelet  $\alpha_{IIb}\beta_3$  expression with serum LDH was found, a significant correlation with levels of fetal haemoglobin was observed. Such a correlation indicates that levels of this polymerization-inhibiting haemoglobin may directly or indirectly affect platelet activation. Accordingly, high levels of fetal haemoglobin have been associated with decreased phosphatidylserine exposure on erythrocytes in SCD and, in turn, decreased generation of TB (Setty *et al*, 2000).

Numerous signalling pathways regulate platelet activation; however, of these, cAMP is known to interrupt many of these pathways and play an important role in down-regulating platelet activation (Zhang & Colman, 2007). cAMP synthesis is stimulated by the induction of adenylate cyclase by mediators such as prostacyclin and adenosine. Levels of cAMP can also be regulated via their degradation by phosphodiesterases (PDE) (Bender & Beavo, 2006). Basal levels of cAMP restrict various key activation processes including calcium mobilization, cytoskeletal reorganization and  $\alpha_{IIb}\beta_3$  activation (Feijge *et al*, 2004). Evidence suggests that TB potentiates platelet activation by inducing a reduction in intracellular cAMP, by both inhibiting

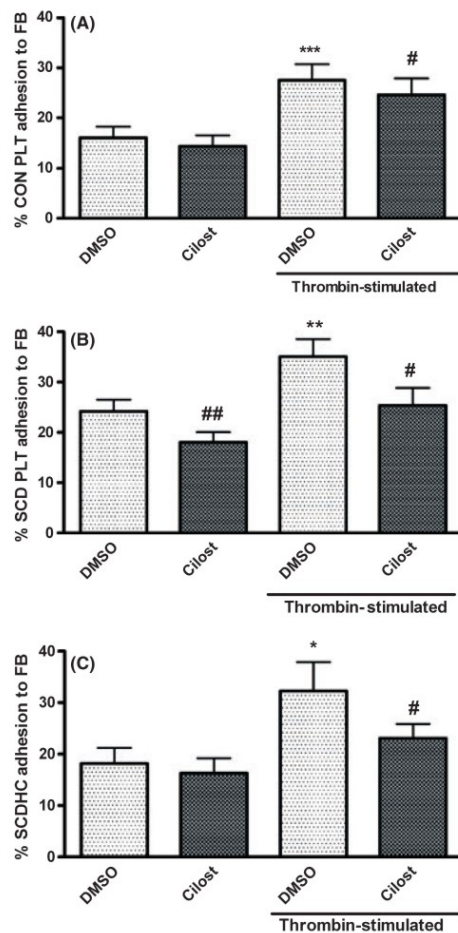


Fig 4. Effect of the PDE3A inhibitor, Cilostazol, upon platelet adhesion to fibrinogen, *in vitro*. Platelets from (A) healthy control individuals ( $n \geq 12$ ); (B) steady-state SCD individuals ( $n \geq 7$ ) and (C) SCD patients on hydroxycarbamide therapy ( $n \geq 6$ ) were co-incubated with  $1.7 \mu\text{mol/l}$  cilostazol, or DMSO vehicle, and allowed to adhere to FB ( $50 \mu\text{g/ml}$ ) in the presence or absence of a TB stimulus ( $50 \text{ mU/ml}$ ,  $37^\circ\text{C}$ ,  $15 \text{ min}$ ). Platelet adhesion is expressed as the mean percentage of platelets adhered  $\pm$  SEM. \* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ ; \*\*\* $P < 0.001$ , compared to non-TB-stimulated basal DMSO adhesion; # $P < 0.05$ ; ## $P < 0.01$ , compared to DMSO vehicle.

adenylate cyclase activity and activating the major platelet cAMP-hydrolyzing PDE, PDE3A (Zhang & Colman, 2007). Our data demonstrate that levels of intracellular cAMP are significantly reduced in SCD platelets and that these levels were similar to those found in TB-stimulated control platelets. Cilostazol, a specific inhibitor of PDE3A, but not the PDE1

inhibitor, vinpocetine, significantly reduced the adhesion of SCD platelets and of TB-induced platelets, suggesting the participation of PDE3A activation in the reduction of SCD platelet cAMP and that reduced cAMP appears to contribute to the augmented adhesive properties of SCD. Furthermore, it may be speculated that reduced cAMP may participate in the activation of  $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$  integrin in SCD platelets (Feijge *et al*, 2004).

Correlation of intracellular cAMP with  $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$  activation in SCD/SCDHC platelets indicated an association between these parameters (Spearman  $r$ ,  $-0.527$ ;  $P = 0.09$ ,  $n = 11$ ), which, while not found to be significant, could further indicate that low cAMP in SCD platelets contributes to platelet activation in SCD. Interestingly, as seen for  $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$  activation, intraplatelet cAMP was observed to significantly correlate with levels of fetal haemoglobin in both the SCD and SCDHC patient groups, again indicating an effect of Hb S polymerization in red cells on levels of a circulating adenylyl cyclase activator, such as thrombin. Paradoxically, augmented cAMP-dependent signalling is associated with augmented adhesive properties of both red cells and leucocytes in SCD (Hines *et al*, 2003; Canalli *et al*, 2007); whilst there is evidence that cAMP may participate in the regulation of HbF in developing erythroid cells (Keefer *et al*, 2006; Kuroyanagi *et al*, 2006; Bailey, 2007). Thus, whilst the interplay between these signalling pathways in different cell types is not presently understood, it is clear that cyclic nucleotide pathways participate in various aspects of the pathophysiological mechanisms of SCD.

Decreased nitric oxide (NO) bioavailability in SCD, due to haemolysis, has been suggested to participate in platelet activation in SCD (Villagra *et al*, 2007). NO is a key regular of platelet function, inhibiting platelet adhesive, secretion and aggregation properties, in a mechanism that occurs principally via the formation of the second messenger, cGMP (Oberprieler *et al*, 2007a; Naseem & Riba, 2008). cGMP, in turn, regulates the platelet cAMP pathway by competitively inhibiting PDE3A, permitting cAMP accumulation (Maurice & Haslam, 1990; Hung *et al*, 2008; Naseem & Riba, 2008). Determination of intracellular cGMP demonstrated similar levels of this cyclic nucleotide in control and SCD platelets, suggesting that platelet cGMP-dependent signalling is not significantly affected by diminished NO bioavailability in SCD individuals. NO, however, has numerous cGMP-independent effects and  $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ -integrin activity may be inhibited by direct S-nitrosylation in response to NO (Oberprieler *et al*, 2007b). As such, a contribution of diminished NO bioavailability to the increased platelet adhesive properties observed should not be disregarded and, certainly, NO repletion or targeted NO second messenger therapies may be of use in the inhibition of platelet activation, and consequently adhesion, in SCD. Indeed, administration of the PDE-5 inhibitor, sildenafil, has been shown to reduce platelet activation in patients with SCD (Villagra *et al*, 2007); at least part of the effect of PDE5 inhibitors on platelet function is thought to be mediated through cGMP inhibition of PDE3 and subsequent increases in cAMP (Bender & Beavo, 2006), demonstrating these pathways

to be important targets for decreasing platelet activation and adhesion in SCD. Cilostazol is currently approved for the treatment of intermittent claudication in patients with peripheral arterial disease (O'Donnell *et al.*, 2009) and a potential for its use in the inhibition of platelet activation in SCD should not be overlooked.

Importantly, platelets from SCD individuals on HC therapy presented similar levels of  $\alpha_{IIb}\beta_3$  activation, intracellular cAMP and adhesive properties to those of healthy control platelets. Given that platelet  $\alpha_{IIb}\beta_3$  activation and cAMP levels appear to be associated with levels of fetal haemoglobin, it is possible that the increase in fetal haemoglobin that generally occurs during HC therapy may be responsible for lower platelet activation and adhesive properties. Whilst there is currently no evidence to suggest that HC therapy reduces TB generation, it is conceivable that the increased HbF levels associated with HC diminish phosphatidylserine exposure on red cells, resulting in a reduced activation of coagulation (Setty *et al.*, 2000). Evidence exists to suggest that HC has NO donor properties (King, 2004) and relatively higher intraplatelet levels of cGMP were observed in patients on HC therapy. As such, a potential role for a cGMP-dependent augmentation of cAMP in the reduction of platelet adhesive properties, associated with HC therapy, should also not be disregarded.

In conclusion, our findings indicate that human SCD platelets may have an increased ability to adhere to proteins encountered on the vascular wall, particularly fibrinogen. We suggest that platelets could make an important contribution to the vaso-occlusive process, as the liberation of potent platelet-derived inflammatory mediators by activated platelets at sites of occlusion may well participate in activation of the endothelium and the perpetuation of the chronic inflammatory state that is thought to drive the vaso-occlusive process. Data demonstrate roles for activated  $\alpha_{IIb}\beta_3$ -integrin, cAMP-dependent signalling and PDE3A activity in augmented platelet adhesive properties in SCD and provide insight into the mechanisms involved in platelet activation in SCD. Hydroxycarbamide and, speculatively, NO donor or cyclic-nucleotide targeted therapies may aid in the reversal of platelet adhesive properties.

## Acknowledgements

The authors would like to thank Fernanda Pereira Cunha for help with flow cytometry. This study was supported by FAPESP (Grants 07/50853-9 and 06/58788-9) and CNPq. The Haematology and Haemotherapy Centre, UNICAMP forms part of the National Institute of Blood, Brazil (INCT de Sangue – CNPq/MCT).

## References

- Bailey, L., Kuroyanagi, Y., Franco-Penteado, C.F., Conran, N., Costa, F.F., Ausenda, S., Cappellini, M.D. & Ikuta, T. (2007) Expression of the gamma-globin gene is sustained by the cAMP-dependent pathway in beta-thalassaemia. *British Journal of Haematology*, **138**, 382–395.
- Bellavite, P., Andrioli, G., Guzzo, P., Arigliano, P., Chirumbolo, S., Manzato, F. & Santonastaso, C. (1994) A colorimetric method for the measurement of platelet adhesion in microtiter plates. *Analytical Biochemistry*, **216**, 444–450.
- Bender, A.T. & Beavo, J.A. (2006) Cyclic nucleotide phosphodiesterases: molecular regulation to clinical use. *Pharmacological Reviews*, **58**, 488–520.
- Brittain, J.E., Knoll, C.M., Ataga, K.L., Orringer, E.P. & Parise, L.V. (2008) Fibronectin bridges monocytes and reticulocytes via integrin  $\alpha_4\beta_1$ . *British Journal of Haematology*, **141**, 872–881.
- Canali, A.A., Franco-Penteado, C.F., Traina, F., Saad, S.T., Costa, F.F. & Conran, N. (2007) Role for cAMP-protein kinase A signalling in augmented neutrophil adhesion and chemotaxis in sickle cell disease. *European Journal of Haematology*, **79**, 330–337.
- Conran, N. & Costa, F.F. (2009) Hemoglobin disorders and endothelial cell interactions. *Clinical Biochemistry*, **42**, 1824–1838.
- Eriksson, A.C. & Whiss, P.A. (2009) Characterization of static adhesion of human platelets in plasma to protein surfaces in microplates. *Blood Coagulation and Fibrinolysis*, **20**, 197–206.
- Feijge, M.A., Ansink, K., Vanschoonbeek, K. & Heemskerk, J.W. (2004) Control of platelet activation by cyclic AMP turnover and cyclic nucleotide phosphodiesterase type-3. *Biochemical Pharmacology*, **67**, 1559–1567.
- van Gils, J.M., Zwaginga, J.J. & Hordijk, P.L. (2009) Molecular and functional interactions among monocytes, platelets, and endothelial cells and their relevance for cardiovascular diseases. *Journal of Leukocyte Biology*, **85**, 195–204.
- Hidalgo, A., Chang, J., Jang, J.E., Peired, A.J., Chiang, E.Y. & Frenette, P.S. (2009) Heterotypic interactions enabled by polarized neutrophil microdomains mediate thromboinflammatory injury. *Nature Medicine*, **15**, 384–391.
- Hines, P.C., Zen, Q., Burney, S.N., Shea, D.A., Ataga, K.L., Orringer, E.P., Telen, M.J. & Parise, L.V. (2003) Novel epinephrine and cyclic AMP-mediated activation of BCAM/Lu-dependent sickle (SS) RBC adhesion. *Blood*, **101**, 3281–3287.
- Hung, S.H., Liu, A.H., Pixley, R.A., Francis, P., Williams, L.D., Matsko, C.M., Barnes, K.D., Sivendran, S., Colman, R.F. & Colman, R.W. (2008) A new nonhydrolyzable reactive cGMP analogue, (Rp)-guanosine-3',5'-cyclic-S-(4-bromo-2,3-dioxobutyl)-monophosphorothioate, which targets the cGMP binding site of human platelet PDE3A. *Bioorganic Chemistry*, **36**, 141–147.
- Keefer, J.R., Schneidereith, T.A., Mays, A., Purvis, S.H., Dover, G.J. & Smith, K.D. (2006) Role of cyclic nucleotides in fetal hemoglobin induction in cultured CD34+ cells. *Experimental Hematology*, **34**, 1151–1161.
- King, S.B. (2004) Nitric oxide production from hydroxyurea. *Free Radical Biology & Medicine*, **37**, 737–744.
- Kuroyanagi, Y., Kaneko, Y., Muta, K., Park, B.S., Moi, P., Ausenda, S., Cappellini, M.D. & Ikuta, T. (2006) cAMP differentially regulates gamma-globin gene expression in erythroleukemic cells and primary erythroblasts through c-Myb expression. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **344**, 1038–1047.
- Lee, S.P., Ataga, K.L., Orringer, E.P., Phillips, D.R. & Parise, L.V. (2006) Biologically active CD40 ligand is elevated in sickle cell anemia: potential role for platelet-mediated inflammation. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*, **26**, 1626–1631.

- Maurice, D.H. & Haslam, R.J. (1990) Molecular basis of the synergistic inhibition of platelet function by nitrovasodilators and activators of adenylate cyclase: inhibition of cyclic AMP breakdown by cyclic GMP. *Molecular Pharmacology*, **37**, 671–681.
- Montes, R.A., Eckman, J.R., Hsu, L.L. & Wick, T.M. (2002) Sick erythrocyte adherence to endothelium at low shear: role of shear stress in propagation of vaso-occlusion. *American Journal of Hematology*, **70**, 216–227.
- Naseem, K.M. & Riba, R. (2008) Unresolved roles of platelet nitric oxide synthase. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, **6**, 10–19.
- Oberprieler, N.G., Roberts, W., Graham, A.M., Homer-Vanniasinkam, S. & Naseem, K.M. (2007a) Inhibition of ADP-induced platelet adhesion to immobilised fibrinogen by nitric oxide: evidence for cGMP-independent mechanisms. *Biochemical Pharmacology*, **73**, 1593–1601.
- Oberprieler, N.G., Roberts, W., Riba, R., Graham, A.M., Homer-Vanniasinkam, S. & Naseem, K.M. (2007b) cGMP-independent inhibition of integrin  $\alpha$ IIb $\beta$ 3-mediated platelet adhesion and outside-in signalling by nitric oxide. *FEBS Letters*, **581**, 1529–1534.
- O'Donnell, M.E., Badger, S.A., Sharif, M.A., Makar, R.R., Young, I.S., Lee, B. & Soong, C.V. (2009) The vascular and biochemical effects of cilostazol in diabetic patients with peripheral arterial disease. *Vascular and Endovascular Surgery*, **43**, 132–143.
- Papadimitriou, C.A., Travlou, A., Kalos, A., Douratsos, D. & Lali, P. (1993) Study of platelet function in patients with sickle cell anemia during steady state and vaso-occlusive crisis. *Acta Haematologica*, **89**, 180–183.
- Rodgers, G.P., Schechter, A.N., Noguchi, C.T., Klein, H.G., Nienhuis, A.W. & Bonner, R.F. (1984) Periodic microcirculatory flow in patients with sickle-cell disease. *New England Journal of Medicine*, **311**, 1534–1538.
- Setty, B.N., Kulkarni, S., Rao, A.K. & Stuart, M.J. (2000) Fetal hemoglobin in sickle cell disease: relationship to erythrocyte phosphatidylserine exposure and coagulation activation. *Blood*, **96**, 1119–1124.
- Tabuchi, A. & Kuebler, W.M. (2008) Endothelium-platelet interactions in inflammatory lung disease. *Vascular Pharmacology*, **49**, 141–150.
- Tomer, A., Harker, L.A., Kasey, S. & Eckman, J.R. (2001) Thrombogenesis in sickle cell disease. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, **137**, 398–407.
- Villagra, J., Shiva, S., Hunter, L.A., Machado, R.F., Gladwin, M.T. & Kato, G.J. (2007) Platelet activation in patients with sickle disease, hemolysis-associated pulmonary hypertension, and nitric oxide scavenging by cell-free hemoglobin. *Blood*, **110**, 2166–2172.
- Wagner, D.D. & Frenette, P.S. (2008) The vessel wall and its interactions. *Blood*, **111**, 5271–5281.
- Westwick, J., Watson-Williams, E.J., Krishnamurthi, S., Marks, G., Ellis, V., Scully, M.F., White, J.M. & Kakkar, V.V. (1983) Platelet activation during steady state sickle cell disease. *Journal of Medicine*, **14**, 17–36.
- Wood, K.C., Heibel, R.P. & Granger, D.N. (2004) Endothelial cell P-selectin mediates a proinflammatory and prothrombotic phenotype in cerebral venules of sickle cell transgenic mice. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*, **286**, H1608–H1614.
- Wun, T., Paglieroni, T., Field, C.L., Welborn, J., Cheung, A., Walker, N.J. & Tablin, F. (1999) Platelet-erythrocyte adhesion in sickle cell disease. *Journal of Investigative Medicine*, **47**, 121–127.
- Wun, T., Cordoba, M., Rangaswami, A., Cheung, A.W. & Paglieroni, T. (2002) Activated monocytes and platelet-monocyte aggregates in patients with sickle cell disease. *Clinical and Laboratory Haematology*, **24**, 81–88.
- Zhang, W. & Colman, R.W. (2007) Thrombin regulates intracellular cyclic AMP concentration in human platelets through phosphorylation/activation of phosphodiesterase 3A. *Blood*, **110**, 1475–1482.