

**LEDIANA IAGALO MIGUEL**

**PAPEL DOS MEDIADORES  
INFLAMATÓRIOS NAS PROPRIEDADES  
ADESIVAS DOS NEUTRÓFILOS DE  
PACIENTES COM ANEMIA FALCIFORME E  
OS EFEITOS DE DROGAS MODULADORAS  
DE NUCLEOTÍDEOS CÍCLICOS NESTA  
ADESÃO**

**CAMPINAS**

**2010**

**LEDIANA IAGALO MIGUEL**

**PAPEL DOS MEDIADORES  
INFLAMATÓRIOS NAS PROPRIEDADES  
ADESIVAS DOS NEUTRÓFILOS DE  
PACIENTES COM ANEMIA FALCIFORME E  
OS EFEITOS DE DROGAS MODULADORAS  
DE NUCLEOTÍDEOS CÍCLICOS NESTA  
ADESÃO**

*Tese de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas para a Obtenção do Título de Mestre em Ciências Médicas área de concentração em Ciências Biomédicas*

**ORIENTADORA:** Dra. Nicola Conran Zorzetto

CAMPINAS

2010

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DA UNICAMP**

Bibliotecário: Sandra Lúcia Pereira – CRB-8ª / 6044

M588p Miguel, Lediana Iagalo  
Papel dos mediadores inflamatórios nas propriedades adesivas dos neutrófilos de pacientes com Anemia Falciforme e os efeitos de drogas moduladoras de nucleotídeos cíclicos nesta adesão / Lediana Iagalo Miguel. Campinas, SP : [s.n.], 2010.

Orientador : Nicola Amanda Conran Zorzetto  
Dissertação ( Mestrado ) Universidade Estadual de Campinas.  
Faculdade de Ciências Médicas.

1. Citocina. 2. Inflamação. 3. Neutrófilos. 4. Anemia falciforme. I. Zorzetto, Nicola Amanda Conran. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

**Título em inglês: “Role of inflammatory mediators in the adhesive properties of neutrophils from sickle cell disease individuals and the effects of cyclic nucleotide drug modulators on this adhesion”**

**Keywords:**

- Cytokin
- Inflammation
- Neutrophil
- Sickle cell

**Titulação: Mestre em Ciências Médicas**

**Área de concentração: Ciências Biomédicas**

**Banca examinadora:**

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

**Profa. Dra. Sandra Fátima Menosi Gualandro**

**Profa. Dra. Maria Heloisa Souza Lima Blotta**

**Data da defesa: 25-02-2010**

# Banca examinadora da Dissertação de Mestrado

## Lediane Iagalo Miguel

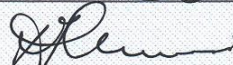
**Orientadora:** Profa. Dra. Nicola Amanda Conran Zorzetto

### Membros:

1. Profa. Dra. Nicola Amanda Conran Zorzetto -



2. Profa. Dra. Sandra Fátima Menosi Gualandro -



3. Profa. Dra. Maria Heloisa de Souza Lima Blotta -



Curso de pós-graduação em Ciências Médicas da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

**Data:** 25/02/2010

## ***Dedicatória***

*Aos meus pais José Pedro e Cleide,  
meus exemplos, por acreditarem em  
mim, que com compreensão,  
incentivo, paciência, perseverança e  
acima de tudo amor e carinho  
incondicionais, proporcionaram a  
concretização desse sonho...*

*Ao meu marido Péricles, meu anjo  
da guarda, pela compreensão, dedicação,  
companheirismo, cumplicidade, apoio e  
incentivo para poder prosseguir em todos os  
momentos, contribuiu de forma inimaginável  
sem poupar esforços para eu chegar até  
aqui...*

## AGRADECIMENTOS

---

Primeiramente à Deus, meu eterno protetor e fonte de conforto! Qualquer lampejo de sabedoria é originado por sua iluminação.

À Dra. Nicola, pela oportunidade, orientação, paciência e carinho. Muito obrigada pela amizade e apoio!

Ao Dr. Fernando F. Costa pela oportunidade em fazer parte desse grupo de pesquisa.

Ao meu amado Péricles, pela dedicação, apoio, amor e carinho, que tornaram estes anos mais fáceis principalmente pela sabedoria intelectual e espiritual. Agradeço todos os dias pela benção da sua presença em minha vida, com certeza ela não teria o mesmo sabor e a mesma felicidade na realização deste sonho se você não fizesse parte integral dela. Amo você!

Aos meus queridos pais, José Pedro e Cleide, as maiores dádivas que Deus me deu, pela persistência e luta em investir na educação da família, por não pouparem esforços para a concretização deste sonho. Obrigada por serem meus pais, por acreditarem em mim, enfim, por tudo. Amo demais vocês!

Às minhas irmãs e cunhados, Leandra e Valter, Lessandra e Alexandre, por todo apoio, carinho e incentivo. Obrigada por acreditarem em mim. Meu amor e minha gratidão por vocês serão sempre eternos!

À todos da minha segunda família, a Família Teles, pelo carinho, apoio e compreensão! Em especial, aos meus sogros João Teles e Odiléa pela fé indispensável!

À minha amiga do coração Jeanine, pelo exemplo, incentivo e carinho, obrigada por tantas risadas e lágrimas compartilhadas.

À Andréia Canalli, por ser o meu ponto de partida desta jornada. Obrigada por todos os ensinamentos, por compartilhar conhecimentos, pelo carinho, apoio e incentivo no desenvolvimento deste trabalho.

À Carol Lanaro, pela indicação e por acreditar em mim. Obrigada pelo carinho, amizade, apoio e principalmente pela dedicação no desenvolvimento desta tese.

Ao meu grande amigo Rafael Lanaro, por acreditar em mim e me incentivar para a vida acadêmica. Obrigada por ser meu amigo, pelo carinho e apoio.

Às amigas especiais, Renata, Camila, Sheley, Venina, Diana e Flávia Pallis, por me ajudarem literalmente no desenvolvimento deste trabalho, pelo apoio, carinho e dedicação. Vocês foram fundamentais em minha vida nesses anos!

Aos amigos inesquecíveis do hemocentro, Marcos André, Ana Flávia, Cíntia, Carlinha, Regiane, Vanessa, Dul, Flávia Boca, Kleber, Anderson, Fernanda, Emília, Tatiana, Daniela, Denise, Simone, Lena, Ucha, que direta ou indiretamente, me apoiaram.

Aos meus amigos do Hospital Municipal Mário Gatti, obrigada pela torcida!!

## RESUMO

---

A adesão anormal das células brancas e vermelhas ao endotélio, que desencadeia numa diminuição do fluxo de sangue na microcirculação, é um dos principais fatores envolvidos na iniciação da vaso-oclusão em pacientes falciformes (AF). O estado inflamatório crônico, característico nos pacientes com AF, eleva a circulação de citocinas, as quais podem contribuir significativamente para a ativação e adesão das células vermelhas e brancas ao endotélio. O óxido nítrico (NO) e a via de sinalização dependente em NO têm importante efeito inibidor nas propriedades adesivas de leucócitos. Drogas que aumentem a biodisponibilidade de NO ou que atuem na via de sinalização NO-GMPc podem ser benéficas no tratamento de alguns aspectos da AF. Já é de conhecimento que pacientes com AF apresentam níveis elevados de algumas citocinas presentes no plasma, assim sendo, este estudo teve como objetivo avaliar os efeitos *in vitro* das citocinas nas propriedades adesivas de neutrófilos e células vermelhas de indivíduos controles e pacientes com AF. Adicionalmente, foram determinados os efeitos de BAY 73-6691, um inibidor da enzima hidrolizante de GMPc, fosfodiesterase 9A (PDE9A) e BAY 41-2272, um ativador de guanilato ciclase, na ausência ou presença da estimulação pelas citocinas na adesão dessas células. Os neutrófilos e as células vermelhas de indivíduos controles e pacientes com AF foram isolados de sangue periférico. A adesão das células à fibronectina foi determinada utilizando o ensaio de adesão estático na presença ou ausência das citocinas IL-8 (10-500ng/ml), TNF-alpha (10-100ng/ml) e GM-CSF (0,1-10ng/ml) e/ou na presença/ausência de BAY 73-6691 (60μM), BAY 41-2272 (60nM) ou DMSO como veículo (0.2%v/v). Como previamente demonstrado, os neutrófilos de pacientes com AF (neutrófilos AF) possuem uma maior capacidade de aderir à FN do que os neutrófilos de indivíduos controle (neutrófilos CON). A estimulação das células *in vitro* com as três citocinas aumentaram significativamente as adesões à FN dos neutrófilos CON e aumentou ainda mais a adesão dos neutrófilos AF. A incubação de ambos os neutrófilos, CON e AF, com BAY 73-6691, mas não BAY 41-2272, reduziu significativamente as propriedades adesivas à FN; esse evento foi acompanhado por uma diminuição da expressão das moléculas de adesão, L-selectina e CD11b (subunidade Mac-1) na superfície de neutrófilos AF. Além do mais, nas concentrações utilizadas, BAY 73-6691, mas não o BAY 41-2272, diminui significativamente a adesão

de neutrófilos CON e AF após estimulação com IL-8, TNF- $\alpha$  e GM-CSF. No entanto, esse evento não foi acompanhado por alterações na expressão da moléculas de adesão na superfície de neutrófilos AF quando estimulados com IL-8. As células vermelhas de indivíduos AF também apresentaram uma maior capacidade de se aderir à FN quando comparadas às células de indivíduos controles. No entanto, ao contrário dos neutrófilos, na presença de IL-8 (10-500ng/ml) e TNF- $\alpha$  (0.1-1 $\mu$ g/ml), não houve alteração das propriedades adesivas dessas células tanto de indivíduos controles quanto das células de pacientes com AF. Além disso, BAY 73-6691 e BAY 41-2272, não alteraram a adesão basal tanto das células vermelhas de controles quanto pacientes com AF. Os principais mediadores inflamatórios, utilizados em concentrações fisiologicamente relevantes, foram capazes de aumentar as propriedades adesivas de neutrófilos, mas não das células vermelhas, de indivíduos controles e AF. Portanto, sugerimos que as citocinas inflamatórias circulantes podem desempenhar um papel na indução das propriedades adesivas dos neutrófilos em pacientes falciformes; em contrapartida, outros fatores além do estímulo inflamatório, podem ser mais importante para induzir a adesão das células vermelhas de pacientes AF. Dados sugerem que agentes que aumentam os níveis de GMPc intracelular podem ser úteis para reduzir as propriedades adesivas de neutrófilos AF, mesmo na presença de um estado inflamatório. PDE9A é altamente expressa pelas células hematopoiéticas e a inibição desta enzima, com conseqüente elevação de GMPc, pode representar um alvo terapêutico para drogas que são tecido/célula específicas, necessitando de mais estudos *in vivo* e *in vitro* para a terapêutica de AF.



## ABSTRACT

---

The adhesion of both red and white cells to the vessel walls of the microcirculation initiates vaso-occlusion in sickle cell disease (SCD). The chronic inflammatory nature of SCD leads to elevation of circulating cytokines in patients, which may contribute significantly to the activation of red and white cells and their consequent adhesion. Nitric oxide (NO) and the NO-dependent signaling pathway have important inhibitory effects on cellular adhesive properties. Drugs that enhance NO bioavailability or NO-cGMP-dependent signaling may hold potential for treatment of various aspects of SCD. It is known that levels of certain cytokines are augmented in the plasma of SCD individuals; therefore, this study aimed to observe the effect of cytokines, on the in vitro adhesive properties of neutrophils (neu) and red blood cells (RBC) from healthy control (CON) and steady-state SCD (SCD) individuals. Furthermore, the effects of BAY 73-6691, an inhibitor of the cGMP-hydrolyzing enzyme, phosphodiesterase 9A (PDE9A) and BAY 41-2272, a guanylate cyclase activator, on non-stimulated and cytokine-stimulated cell adhesion were determined. Neutrophils and red blood cells (RBC) were isolated from the peripheral blood of CON and SCD individuals. Cell adhesion to immobilized fibronectin was assessed using static adhesion assays in the presence or absence of the cytokines, IL-8 (10-500ng/ml), TNF-alpha (10-100ng/ml) and GM-CSF (0,1-10ng/ml) and/or in the presence/absence of BAY 73-6691 (10-60μM), BAY 41-2272 (60nM) or DMSO vehicle (0.2%v/v). As previously demonstrated, SCDneu have a greater capacity to adhere to FN than CONneu. Stimulation of cells in vitro with all three cytokines significantly augmented both CONneu adhesion to FN and further increased SCDneu adhesion. The incubation of both CONneu and SCDneu with BAY 73-6691, but not BAY 41-2272, significantly reduced their adhesions to FN; this was accompanied by a decrease in the expressions of the L-selectin and CD11b (Mac-1-subunit) adhesion molecules on the SCAneu surface. Furthermore, BAY 73-6691, but essentially not BAY 41-2272, significantly inhibited CONneu and SCDneu adhesion stimulated by IL-8, TNF-alpha and GM-CSF. However, this was not accompanied by alterations in adhesion molecule presentation on IL-8-stimulated SCAneu. As previously reported, SCD RBC have a greater capacity to adhere to FN, in vitro, compared to CON RBC. However, in contrast to neutrophils, cytokines IL-8 (10-500ng/ml) and TNF-alpha (0.1-1μg/ml) did not alter the capacities of neither CON RBC nor SCD RBC to adhere to FN. Furthermore, BAY 73-6691 and

BAY 41-2272 did not affect either basal CON RBC or SCD RBC adhesion. Key SCD inflammatory mediators were found, at physiologically relevant concentrations, to augment the adhesive properties of neutrophils from control and SCD individuals. Circulating inflammatory cytokines may play a role in the induction of leukocyte adhesive properties in SCD; in contrast factors other than inflammatory stimuli may be more important for induction of SCD RBC adhesion. Data suggest that elevation of intracellular cGMP may be an important approach for reducing SCD leukocyte adhesive properties, even in an inflammatory environment. PDE9A is highly expressed in hematopoietic cells and inhibition of this enzyme, with consequent augmentation of cGMP, may represent a tissue/cell-specific therapeutic drug target worthy of further in vitro and in vivo studies as a therapy for SCD.

## **LISTA DE ABREVIATURAS**

---

8-br-AMPc – 8-bromoadenosine 3'5' cyclic  
AA – neutrófilos de controles  
AC – adenilato ciclase  
ADP – adenosina difosfato  
AF - anemia falciforme  
AMPc - adenosina monofosfato cíclico  
ATP – adenosina trifosfato  
AVC - acidente vascular cerebral  
BSA - soro albumina bovina  
CEP – comitê de ética e pesquisa  
DPOC - doença pulmonar obstrutiva crônica  
CV - células vermelhas  
DEANO - dietilamina-NONOato  
FN - fibronectina  
GC - guanilato ciclase  
GM-CSF - fator estimulante de crescimento de colônias de macrófago-granulócitos  
GMPc - guanosina monofosfato cíclico  
GTP - guanosina trifosfato  
HbS- hemoglobina S  
HbF- hemoglobina fetal  
HU- hidroxiuréia  
ICAM-1- molécula de adesão intercelular  
IL-6- interleucina 6  
IL-8- interleucina 8  
LFA- antígeno de linfócito funcional  
MO – medula óssea  
NFκB – fator nuclear de transcrição  
NO- óxido nítrico  
PAF- fator ativador de plaquetas  
PBS- salina tamponada fosfatada  
PDE- fosfodiesterase  
PGE1 – prostaglandina 1

PGE2 – prostaglandina 2  
PKA- proteína quinase A  
PKG- proteína quinase G  
SNP- nitroprussiato de sódio  
SS- paciente com anemia falciforme  
TCLE – termo de consentimento livre e esclarecido  
TNF $\alpha$ - fator de necrose tumoral  $\alpha$   
VCAM-1- molécula de adesão vascular  
vWF – fator de Von Willebrant

## LISTA DE TABELAS

---

Tabela 1 Principais Manifestações Clínicas e Complicações das Doenças Falciformes (ZAGO <i>et al.</i> , 2004). .....	40
Tabela 2 Aspectos clínicos dos controles AA e pacientes SS que participaram deste estudo.....	71
Tabela 3 Efeito da estimulação de citocinas e co-incubação com agentes que elevam os níveis de GMPc intracelular nas propriedades adesivas de células vermelhas controle e AF. ....	93

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Fisiopatologia da Anemia Falciforme (STEINBERG, 2006). A síntese de hemoglobina S é resultado de uma mutação de ponto, que quando desoxigenada forma polímeros no interior das hemácias, deformando-as e tornando-as rígidas (formato de foice). As hemácias, leucócitos e reticulócitos participam do processo de vaso-oclusão, interagindo e aderindo à parede vascular. A anemia falciforme também é caracterizada pela hemólise intravascular resultando na redução da biodisponibilidade vascular de NO, facilitando a vasoconstrição. EC, célula endotelial; ISC, hemácia irreversivelmente falcizada; N, neutrófilo; R, reticulócito; RBC, hemácia. ....	41
Figura 2: Ativação e emigração celular do neutrófilo após estímulo inflamatório (ETZIONI, 2001). Nas proximidades de uma lesão inflamatória, os neutrófilos aderem-se à parede endotelial, deixam os vasos sanguíneos e movimentam-se ativamente em direção ao foco inflamatório. Este processo envolve várias dezenas ou centenas de moléculas, que são ativadas e desativadas sequencialmente ou movimentadas em diferentes regiões da célula. A ligação e rolamento dessas células à camada endotelial são intermediadas pelas L e P-selectinas enquanto que a firme adesão da célula é intermediada principalmente pelas $\beta_2$ integrinas, Mac-1 e LFA-1, sendo o principal ligante dessas integrinas o ICAM-1. Na anemia falciforme, há evidências que a ativação e adesão dos leucócitos à parede vascular estejam exacerbadas. ....	47
Figura 3: Estrutura química do BAY 41-2272 .....	56
Figura 4: Estrutura química do BAY 73-6691 .....	56
Figura 5: Adesão de neutrófilos de indivíduos sadios (controles) e pacientes com AF (AF) à fibronectina (FN; 20 $\mu$ g/ml) (30 min, 37°C, 5% CO <sub>2</sub> ) . ** p<0.01, comparado com o controle; <i>Test Mann Whitney</i> .....	72
Figura 6: Efeito de ativadores de sinalização dependente de AMPc nas propriedades adesivas de neutrófilos de indivíduos saudáveis. (A) Forskolina, ativador de adenilil ciclase, n=13, (B) 8-br-AMPc, análogo de AMPc, n=20. Os neutrófilos foram incubados em placas de 96 poços, revestidas com FN, na presença de forskolina ou 8-br-AMPc (FN; 30 min, 37°C, 5% CO <sub>2</sub> ). P>0.05 para todos os grupos; <i>ANOVA (repeated measures)</i> .....	74
Figura 7: Efeito de ativadores de sinalização dependente de AMPc nas propriedades adesivas de neutrófilos de indivíduos saudáveis e AF. Os neutrófilos foram incubados em placas de 96 poços, revestidas com FN, na presença de: (A) Prostaglandina E1, n= 11 e (B) Prostaglandina E2, n=10 (FN; 30 min, 37°C, 5% CO <sub>2</sub> ). P>0.05 para todos os grupos; $\otimes$ , P<0.05, comparado com o controle. <i>ANOVA (repeated measures)</i> .....	75
Figura 8: Efeito de moléculas inflamatórias nas propriedades adesivas de neutrófilos de indivíduos saudáveis (controle) e de pacientes com anemia falciforme (AF). (A) IL-8, n $\geq$ 4; (B) TNF $\alpha$ , n $\geq$ 4; (C) GM-CSF, n $\geq$ 4 (FN; 30 min, 37°C, 5% CO <sub>2</sub> ). *, P<0.05; **, P<0.01; ***, P<0.001, comparado com adesão basal (0 ng/ml); $\otimes$ , P<0.05; $\otimes\otimes$ , p<0.01, comparado com o controle; #, P<0.05, comparado com o controle. <i>ANOVA (repeated measures) e Bonferroni Multiple Comparisons Test</i> . 77	77

- Figura 9: Efeito do Bay 73-6691 (60 $\mu$ M) e Bay 41-2272 (60nM) na adesão de neutrófilos de indivíduos saudáveis (controle) e pacientes com AF à fibronectina (30 min, 37°C, 5% CO<sub>2</sub>). \*\*,  $p < 0.01$ , comparado a adesão basal dos neutrófilos controle. ##,  $p < 0.01$ ; ###  $p < 0.001$ , comparado com a adesão basal. N=8, controles; N=10, AF; ANOVA (*repeated measures*) e Bonferroni Multiple Comparisons Test. .... 79
- Figura 10: Efeito do Bay 73-6691 (60  $\mu$ M) e Bay 41-2272 (60 nM) nas propriedades adesivas dos neutrófilos de pacientes com AF e indivíduos controle quando estimulados com moléculas inflamatórias (30 min, 37°C, 5% CO<sub>2</sub>). (A) IL-8 (200 ng/mL); Controles (n=8) e AF (n=6); (B) TNF- $\alpha$  (50 ng/mL); controles (n=12) e AF (n=10); (C) GM-CSF (10 ng/mL); controles (n=7) e AF (n=10); #,  $p < 0.05$ , comp. com adesão basal. \*,  $p < 0.05$ , comp. com adesão basal de neutrófilos controles; ••  $p < 0.01$ , •••  $p < 0.001$ , comp. com a adesão com IL-8/TNF- $\alpha$ /GM-CSF. ANOVA (*repeated measures*) e Bonferroni Multiple Comparisons Test. .... 81
- Figura 11: Efeito do inibidor de ativação de NF $\kappa$ B (400nM) nas propriedades adesivas dos neutrófilos de pacientes com AF e indivíduos controle quando estimulados ou não com moléculas inflamatórias (30 min, 37°C, 5% CO<sub>2</sub>). (A) Neutrófilos de indivíduos controles (n $\geq$ 8); (B) Neutrófilos de indivíduos AF (n $\geq$ 7); \*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$ , comp. com adesão basal. ##  $p < 0.01$  comp. com a adesão com IL-8/TNF- $\alpha$  ou GM-CSF. Paired T test, ANOVA (*repeated measures*) e Bonferroni Multiple Comparisons Test. .... 83
- Figura 12: Efeito do BAY 73-6691 (60  $\mu$ M) e BAY 41-2272 (150 nM) na expressão de (A) CD62L, (B) CD11b e (C) CD11a na superfície de neutrófilos de indivíduos controle (CON) e (D) CD62L, (E) CD11b e (F) CD11a na superfície de neutrófilos de pacientes com anemia falciforme (AF). As células foram incubadas com os agentes por 60 min, 37°C, 5% CO<sub>2</sub> antes de determinar a expressão de proteínas através da citometria de fluxo. A intensidade de fluorescência por célula (MFI) foi determinada por um anticorpo anti-molécula de adesão em 10.000 eventos adquiridos, como descrito. •,  $P < 0.05$ , comparando basal AF/Controle; \*\*\*,  $P < 0.001$ , comparando as células tratadas com BAY 73-6691 com adesão basal; ###,  $P < 0.001$ , comparando as células tratadas com BAY 73-6691 com as células tratadas com BAY 41-2272. Resultados foram apresentados como médias  $\pm$  SEM; N $\geq$  7 para A, B e C e N $\geq$  7 para D, E e F. ANOVA (*repeated measures*) e Bonferroni Multiple Comparisons Test. .... 85
- Figura 13: Efeito do BAY 73-6691 (60  $\mu$ M) e BAY 41-2272 (150 nM) na expressão de (A) CD62L, (B) CD11b e (C) CD11a na superfície de neutrófilos de indivíduos controle (CON) e pacientes com anemia falciforme (AF) estimulados com IL-8 (200 ng/ml). As células foram incubadas com os agentes por 60 min, 37°C, 5%CO<sub>2</sub> na presença ou ausência dos agentes e IL-8, antes de determinar a expressão proteica através de citometria de fluxo. A intensidade de fluorescência por célula (MFI) foi determinada por um anticorpo anti-molécula de adesão em 10.000 eventos adquiridos, como descrito. •,  $P < 0.05$ , comparando basal AF/Controle; \*,  $P < 0.05$ , comparando estímulo por IL-8 com células sem estímulo.  $P = 0.08$ , comparando estímulo IL-8 com células sem estímulo. Resultados foram apresentados como médias  $\pm$  SEM; N $\geq$  5 para A, B e C. ANOVA (*repeated measures*) e Bonferroni Multiple Comparisons Test. .... 87

Figura 14: Efeito do BAY 73-6691 (60  $\mu$ M) e BAY 41-2272 (150 nM) na expressão de (A) CD62L, (B) CD11b e (C) CD11a na superfície de neutrófilos de indivíduos controle (CON) e pacientes com anemia falciforme (AF) estimulados com TNF- $\alpha$  (50 ng/ml). As células foram incubadas com os agentes por 60 min, 37°C, 5%CO<sub>2</sub> na presença ou ausência dos agentes e TNF- $\alpha$ , antes de determinar a expressão das moléculas de adesão na superfície dos neutrófilos através de citometria de fluxo. A intensidade de fluorescência por célula (MFI) foi determinada por um anticorpo anti-molécula de adesão em 10.000 eventos adquiridos, como descrito. \*, P<0.05, comparando estímulo de TNF- $\alpha$  com células sem estímulo. #, P<0.05, comparando BAY 73-6691 com TNF- $\alpha$ . Resultados foram apresentados como médias  $\pm$  SEM; N $\geq$  5 para A, B e C. ANOVA (*repeated measures*) e Bonferroni Multiple Comparisons Test. .... 89

Figura 15: Efeito do BAY 73-6691 (60  $\mu$ M) e BAY 41-2272 (150 nM) na expressão de (A) CD62L, (B) CD11b e (C) CD11a na superfície de neutrófilos de indivíduos controle (CON) e pacientes com anemia falciforme (AF) quando estimulados com GM-CSF (10 ng/ml). As células foram incubadas com os agentes por 60 min, 37°C, 5%CO<sub>2</sub> na presença ou ausência dos agentes e GM-CSF, antes de determinar a expressão protéica através de citometria de fluxo. A intensidade de fluorescência por célula (MFI) foi determinada por um anticorpo anti-molécula em 10.000 eventos adquiridos, como descrito. •, P<0.05, comparando adesão basal CON/AF; p=0.07, quando comparando expressão na presença e ausência de GM-CSF. Resultados foram apresentados como médias  $\pm$  SEM; N $\geq$  5 para A, B e C. ANOVA (*repeated measures*) e Bonferroni Multiple Comparisons Test. .... 91



## SUMÁRIO

---

<b>AGRADECIMENTOS</b> .....	9
<b>RESUMO</b> .....	12
<b>ABSTRACT</b> .....	16
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b> .....	20
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	24
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	26
<b>SUMÁRIO</b> .....	32
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	37
1.1 Histórico.....	37
1.2 Anemia Falciforme .....	38
1.3 Principais manifestações da doença .....	39
1.4 Fisiopatologia da anemia falciforme .....	39
1.5 Mecanismo de vaso-oclusão .....	42
1.6 Hemoglobina Fetal e a Hidroxiuréia .....	43
1.7 O Neutrófilo .....	44
1.8 Mecanismos de adesão de leucócitos .....	44
1.9 As células vermelhas e a anemia falciforme .....	48
1.10 Anemia falciforme e a inflamação .....	49
1.11 Mediadores inflamatórios e a anemia falciforme .....	49
1.11.1 <i>Interleucina-8 (IL-8)</i> .....	49
1.11.2 <i>Fator de Necrose Tumoral <math>\alpha</math></i> .....	50
1.11.3 <i>Fator Estimulador de Colônia de Macrófago-Granulócito (GM-CSF)</i> .....	50
1.12 Fator de transcrição - NF $\kappa$ B .....	51
1.13 Nucleotídeos Cíclicos e a adesão dos neutrófilos na anemia falciforme ....	51
1.14 Drogas moduladoras da via de sinalização de AMPc.....	53
1.15 Drogas moduladoras na via de sinalização de GMPc.....	54
1.16 Justificativa .....	55
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	58
2.1 Objetivos Gerais .....	58
2.2 Objetivos Específicos .....	58
<b>3 CASUÍSTICA E ASPECTOS ÉTICOS</b> .....	61
3.1 Aspectos éticos da pesquisa .....	61
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	63
4.1 Material.....	63
4.2 Separação de Neutrófilos .....	63
4.3 Contagem dos neutrófilos no sangue periférico .....	63
4.4 Tratamento de neutrófilos com mediadores inflamatórios, drogas moduladoras de nucleotídeos cíclicos e fator de transcrição.....	63
4.5 Ensaio de adesão estático de neutrófilos.....	64
4.6 Leitura do Ensaio de Adesão.....	65
4.7 Separação de Células Vermelhas .....	65
4.8 Contagem das células vermelhas no sangue periférico .....	66
4.9 Ensaio de adesão estático das células vermelhas .....	66
4.10 Tratamento das células vermelhas com mediadores inflamatórios, drogas moduladoras de nucleotídeos cíclicos e fator de transcrição.....	67
4.11 Citometria de fluxo .....	68
4.12 Análise dos dados .....	69

<b>5</b>	<b>RESULTADOS</b>	71
5.1	Aspectos clínicos dos indivíduos controles e pacientes que participaram do estudo	71
5.2	Adesão de neutrófilos controle e de pacientes com AF à FN <i>in vitro</i>	72
5.3	Efeito de ativadores da via AMPc nas propriedades adesivas de neutrófilos controles e AF <i>in vitro</i>	73
5.4	Efeito de moléculas inflamatórias nas propriedades adesivas de neutrófilos controle e AF	76
5.5	Efeito de agentes que elevam os níveis de GMPc intracelular sobre as propriedades adesivas dos neutrófilos de pacientes com AF e indivíduos controle	78
5.6	Efeito de agentes que elevam os níveis de GMPc intracelular sobre as propriedades adesivas dos neutrófilos AF e controle na presença de um estímulo inflamatório	80
5.7	Efeito do inibidor de ativação de NFκB nas propriedades adesivas dos neutrófilos AF e controle	82
5.8	Efeito de agentes que elevam os níveis de GMPc intracelular na expressão de moléculas de adesão na superfície dos neutrófilos de pacientes com AF e indivíduos controle	84
5.9	Efeito de agentes que elevam os níveis de GMPc intracelular na expressão de moléculas de adesão na superfície de neutrófilos AF após estimulação com IL-8	86
5.10	Efeito de agentes que elevam os níveis de GMPc intracelular na expressão de moléculas de adesão na superfície de neutrófilos AF após estimulação com TNF-α	88
5.11	Efeito de agentes que elevam os níveis de GMPc intracelular na expressão de moléculas de adesão na superfície de neutrófilos AF após estimulação com GM-CSF	90
5.12	Efeito das moléculas inflamatórias e de agentes que elevam os níveis de GMPc intracelular nas propriedades adesivas de células vermelhas controle e AF	92
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO</b>	95
<b>7</b>	<b>CONCLUSÃO</b>	103
<b>8</b>	<b>BIBLIOGRAFIA</b>	105
<b>9</b>	<b>ANEXOS</b>	117
9.1	Resumo apresentado na categoria oral no Congresso Brasileiro de Hematologia e Hemoterapia em novembro de 2008 (São Paulo, Brasil)	117
9.2	Resumo apresentado na categoria de pôster em junho de 2009: “14 <sup>th</sup> Congress of European Hematology Association, EHA” (Berlim, Alemanha)	119
9.3	Resumo apresentado na categoria de pôster em outubro de 2009 no V Simpósio Brasileiro de Doença Falciforme e outras Hemoglobinopatias em outubro de 2009 (Belo Horizonte, Minas Gerais)	121
9.4	Resumo apresentado na categoria de pôster em dezembro de 2009: “51 <sup>st</sup> American Society of Hematology, ASH” (New Orleans, LA, EUA)	124
9.5	Artigo submetido em 07 de janeiro de 2010 – <i>European Journal of Haematology</i>	127

# INTRODUÇÃO

---

# **1 INTRODUÇÃO**

## **1.1 Histórico**

A doença falciforme foi descrita pela primeira vez em 1910, em um estudante de odontologia que apresentava sintomas pulmonares (HERRICK, 1910). Herrick designou o termo de “forma de foice” para descrever a peculiar aparência das hemácias deste paciente (HERRICK, 1924). No Brasil, a primeira referência a um paciente com anemia falciforme se deve a Castro, em 1933 (CASTRO, 1933). Vários casos foram descritos durante os 15 anos seguintes, apoiando a idéia de que esta era uma nova entidade de doença e fornecendo provas suficientes para uma descrição clínica e patológica preliminar (SYDENSTRICKER, 1924). A hipótese de que esta doença poderia ser originada devido a uma anomalia na molécula de hemoglobina foi confirmada em 1949 através da migração diferencial por eletroforese em gel da hemoglobina falciforme comparada com hemoglobinas normais (PAULING *et al.*, 1949). Nesse mesmo ano, a herança autossômica recessiva da doença foi elucidada (NEEL, 1949). Concomitantemente, Watson e cols (1948), previram a importância da hemoglobina fetal (HbF), sugerindo que a sua presença poderia explicar o longo período para a falcização das hemácias de recém-nascidos em comparação com as de mães com anemia falciforme.

Ingram e cols (1958) demonstraram pouco tempo depois que a hemoglobina mutante (HbS) difere da hemoglobina normal (HbA) por um único aminoácido. Estudos posteriores analisaram a estrutura e as propriedades físicas da HbS, a qual formava polímeros intracelulares sob desoxigenação (FERRONE, 2004). Estes estudos colocaram a doença falciforme na vanguarda das investigações para elucidar a base molecular de doenças humanas (FRENETTE & ATWEH, 2007).

A anemia falciforme originou-se na África, foi trazida às Américas pela imigração forçada dos escravos, e é atualmente encontrada em toda a Europa, e em grandes regiões da Ásia. Durante o começo do século XVI, os escravos trazidos para o Brasil eram originados principalmente do Senegal e áreas próximas. Na metade do século XVII, os principais portos de origens foram da África Ocidental (Benin) e no final do século, da costa onde os povos falavam a língua Bantu (Namíbia e Angola) (STEINBERG *et al.*, 2001). A distribuição da anemia falciforme (AF) no Brasil é

heterogênea, sendo mais freqüente onde a proporção de antepassados negros na população é maior (Região Nordeste) (CARDOSO & GUERREIRO, 2006).

## **1.2 Anemia Falciforme**

A anemia falciforme é causada devido a uma mutação de ponto envolvendo a troca do aminoácido - ácido glutâmico pela valina na sexta posição da cadeia polipeptídica da globina- $\beta$ , levando conseqüentemente a produção de uma hemoglobina anômala- Hb S (HbS) (STUART & NAGEL, 2004). A HbS quando desoxigenada tem a capacidade de formar polímeros e causar deformação, enrijecimento e fragilidade das células vermelhas, ocasionando diminuição da vida média das hemácias, fenômenos vaso-oclusivos, episódios de dor e lesão de órgãos-alvo (STEINBERG, 1999).

Em geral, os pais de um paciente com AF são portadores assintomáticos de um único gene afetado (heterozigotos), produzindo HbA e HbS (AS), transmitindo cada um deles o gene alterado para a criança, que assim recebe o gene anormal em homozigose. O nome de AF é reservado apenas para indivíduos que têm o gene homozigoto SS. A homozigose para a mutação falciforme (isto é, a doença HbSS) é responsável pela mais comum e mais grave variante da AF. Várias outras variantes genéticas da AF resultam da interação de diferentes mutações dos genes da globina  $\beta$  (FRENETTE & ATWEH, 2007). Assim, as doenças falciformes incluem a AF (SS) e as interações hemoglobina S- $\beta$  talassemia (S/ $\beta$  tal), hemoglobinopatia SC (SC), hemoglobinopatia SD (SD) e hemoglobina S-persistência hereditária de hemoglobina fetal (S/PHHF) (COSTA in ZAGO, 2004).

Uma das características dessa doença é a sua variabilidade clínica, dependente principalmente de fatores hereditários, e fatores adquiridos. Três características geneticamente determinadas têm importância na gravidade da evolução clínica: os níveis de hemoglobina fetal (HbF), a concomitância de alfa-talassemia e os haplótipos associados ao gene da HbS. Os níveis de HbF são inversamente proporcionais à gravidade da doença (STEINBERG & ADEWOYE, 2006). Há cinco diferentes haplótipos associados ao gene da HbS (Senegal, Benin, Bantu, Camarões e Árabe-Indiano). A AF associada aos haplótipos Senegal e Árabe-Indiano é muito mais benigna do que aquelas associadas aos demais haplótipos.

### **1.3 Principais manifestações da doença**

A doença falciforme tem como característica anemia hemolítica crônica e fenômenos vasos-oclusivos com conseqüentes complicações que podem afetar órgãos e sistemas e reduzir a expectativa de vida: episódios de dores articulares, infecções recorrentes, enfartes pulmonares, acidente vascular cerebral (AVC) e retardo do crescimento e maturação sexual (COSTA in ZAGO, 2004). Veja Tabela 1.

Os recém-nascidos portadores de doenças falciformes possuem níveis elevados de HbF e, por essa razão, não apresentam manifestações clínicas significativas. De fato, apenas quando os níveis de HbF declinam significativamente aparecem os primeiros sinais e sintomas da doença, em geral após os seis meses de idade. (COSTA in ZAGO *et al.*, 2004).

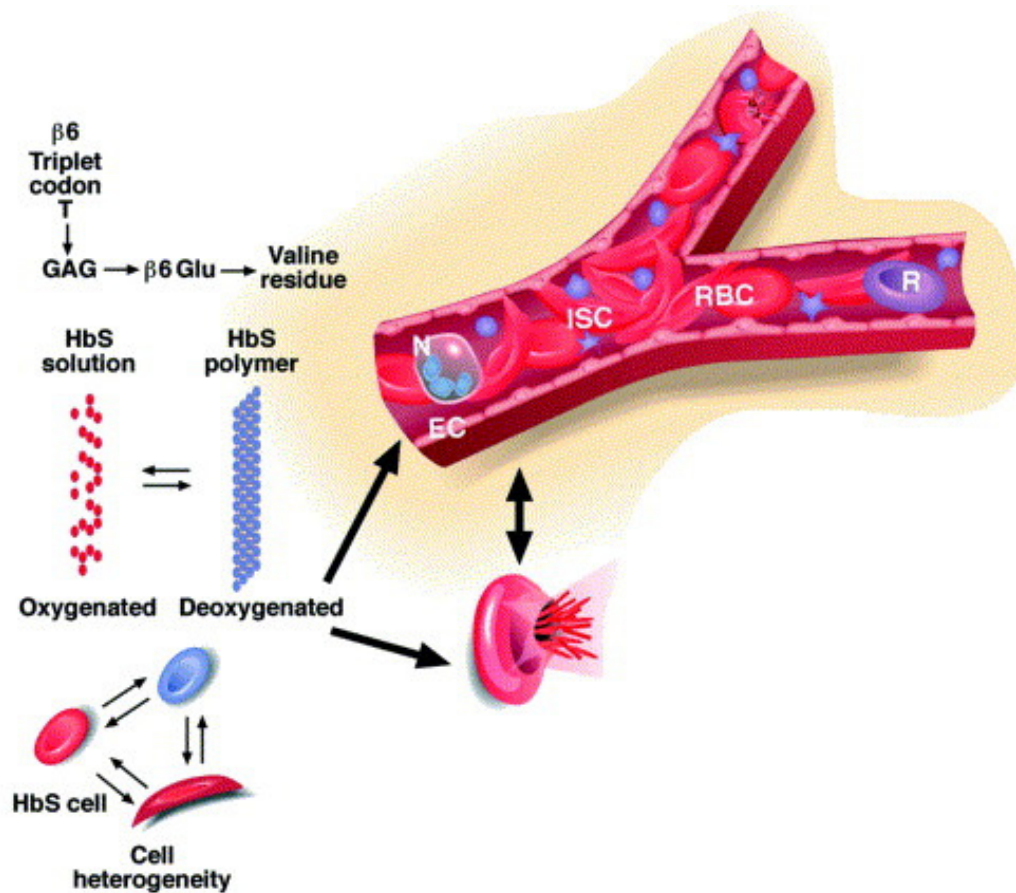
Além disso, crises de falcização na AF são freqüentemente associadas à infecção e leucocitose. A leucocitose tem sido correlacionada com o aumento do índice de morte prematura em crianças com AF, síndrome torácica aguda e acidente vascular cerebral (AVC) (PLATT *et al.*, 1994; MILLER *et al.*, 2000). Paralelamente, a hemostase catiônica anormal das hemácias leva a desidratação das células e a formação de hemácias irreversivelmente falcizadas.

### **1.4 Fisiopatologia da anemia falciforme**

A hemoglobina S, quando desoxigenada, torna-se relativamente insolúvel e agrega-se em longos polímeros, resultando na alteração da forma do eritrócito e na acentuada redução de sua deformabilidade. As células rígidas, que assumem a forma de foice, participam do processo de vaso-oclusão e de lesão de tecidos que representam os principais fenômenos dessa doença (STEINBERG & ADEWOYE, 2006). (Ver Figura 1). Alguns dos fatores que influenciam a polimerização da HbS desoxigenada são: concentração de oxigênio, concentração de HbS, desidratação celular, presença de Hb normais, tempo de circulação dos glóbulos vermelhos na microcirculação, pressão, força iônica, pH e concentração intracelular de hemoglobina fetal (HbF) (De FRANCESCHI & CORROCHE, 2004; STUART & NAGEL, 2004).

**Tabela 1 Principais Manifestações Clínicas e Complicações das Doenças Falciformes (ZAGO *et al.*, 2004).**

<b>PRINCIPAIS MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS E COMPLICAÇÕES DAS DOENÇAS FALCIFORMES</b>	
<b>Sistema linfo-hematopoético</b>	Anemia, Asplenia, Esplenomegalia Crônica (rara), Seqüestro esplênico agudo
<b>Pele</b>	Palidez, Icterícia, Úlceras em perna
<b>Osteoarticular</b>	Síndrome mão-pé, Dores osteoarticulares, Osteomielite, Necrose asséptica da cabeça do fêmur, Compressão vertebral, Gnatopatia
<b>Olhos</b>	Retinopatia proliferativa, Glaucoma, Hemorragia retiniana ou vítrea
<b>Sistema Nervoso Central</b>	Acidente isquêmico transitório, Infarto, Hemorragia cerebral
<b>Cardiopulmonar</b>	Cardiomegalia, Insuficiência Cardíaca, Infarto pulmonar, Pneumonia
<b>Urogenital</b>	Priapismo, Hipostenúria, Proteinúria, Insuficiência Renal Crônica
<b>Gastrointestinal e abdominal</b>	Crises de dor abdominal, Cálculos biliares, Icterícia obstrutiva, Hepatopatia
<b>Geral</b>	Hipodesenvolvimento somático, Retardo da maturação sexual, Maior suscetibilidade a infecções



**Figura 1: Fisiopatologia da Anemia Falciforme (STEINBERG, 2006).** A síntese de hemoglobina S é resultado de uma mutação de ponto, que quando desoxigenada forma polímeros no interior das hemácias, deformando-as e tornando-as rígidas (formato de foice). As hemácias, leucócitos e reticulócitos participam do processo de vaso-oclusão, interagindo e aderindo à parede vascular. A anemia falciforme também é caracterizada pela hemólise intravascular resultando na redução da biodisponibilidade vascular de NO, facilitando a vasoconstrição. EC, célula endotelial; ISC, hemácia irreversivelmente falcizada; N, neutrófilo; R, reticulócito; RBC, hemácia.



## 1.5 Mecanismo de vaso-oclusão

Embora conceitualmente simples, os mecanismos conducentes à vaso-oclusão na anemia falciforme são complexos e ainda não completamente conhecidos. Vários fatores contribuem para a vaso-oclusão, principal causa de morbidade em pacientes com anemia falciforme. A adesão anormal das células brancas e vermelhas ao endotélio, que desencadeia numa diminuição do fluxo de sangue na circulação micro-vascular, é um dos principais fatores envolvidos no processo vaso-oclusivo (ROSSE *et al.*, 2000; STUART & NAGEL, 2004). Estas interações podem ser intermediadas principalmente pela ativação dessas células e pelo aumento na atividade e expressão das moléculas de adesão nas células endoteliais, vermelhas, leucócitos (STUART & NAGEL, 2004; ASSIS *et al.*, 2005; GAMBERO *et al.*, 2007; CONRAN & COSTA, 2009), e proteínas plasmáticas (FRENETTE, 2004). Adicionalmente, o tônus vasomotor anormal favorece a vasoconstrição, devido à diminuição na biodisponibilidade de óxido nítrico (NO) e endotelina-1 (MACK & KATO, 2006). A hemoglobina livre no plasma reage com o NO produzindo metahemoglobina e nitrato. A diminuição do NO no vaso facilita a vasoconstrição, aumenta a ativação plaquetária, e a adesão endotelial e leucocitária levando ao processo vaso-oclusivo (KATO *et al.*, 2007) Estes acontecimentos levam ao aumento do tempo de trânsito do eritrócito na microvasculatura, e conseqüente polimerização da HbS devido à desoxigenação das hemácias e o eventual bloqueio do vaso. O aumento na concentração intracelular de HbS, a queda de pH, a liberação de radicais livres no local e a ativação de coagulação com a formação de trombina, também participam do processo (MACK & KATO, 2006).

As interações moleculares, responsáveis pela adesão das hemácias falcizadas e pelos leucócitos ao endotélio, são mediadas por moléculas de adesão na superfície das células, particularmente as integrinas, VCAM-1 e ICAM-1, presentes nas células endoteliais (SOLOVEY *et al.*, 2001). Proteínas plasmáticas como a fibronectina, o fibrinogênio, fator de von Willebrand e trombospondina, presentes em níveis elevados no plasma de pacientes AF também estão relacionadas à indução da adesão das células falcizadas e leucócitos ao endotélio vascular (KASSCHAU *et al.*, 1996). Resultados demonstram que as plaquetas de pacientes AF podem ter uma importante contribuição para o processo de vaso-oclusão, pois além de apresentar maior habilidade para aderirem ao fibrinogênio, quando ativadas, são importantes fontes de mediadores

inflamatórios que, por sua vez, podem levar a exacerbação da inflamação e ativação celular (PROENÇA *et al.*, 2010).

### **1.6 Hemoglobina Fetal e a Hidroxiuréia**

A hemoglobina fetal (HbF) é composta por duas cadeias alfa e duas cadeias gama globínicas, cuja interação com outros elementos da hemácia confere a essa hemoglobina maior afinidade pelo oxigênio do que a hemoglobina adulta ou HbA (RAMALHO, 1986). A HbF está presente durante a vida embrionária e estudos mostram que há uma redução nos níveis de RNAm de  $\gamma$ -globina e HbF, além da mistura de hemoglobina fetal e adulta no período tardio de desenvolvimento fetal, sugerindo que a troca da HbF pela HbS está quase na metade do momento do nascimento e provavelmente algum passo no período pós-natal (por exemplo, a respiração ou algum outro estímulo que ocorre durante o nascimento) que desencadeia o silenciamento do gene que codifica  $\gamma$ -globina (ONEAL *et al.*, 2006). Existem dados que mostram que crianças falciformes apresentam um atraso na troca de  $\gamma$  por  $\beta$  globina, chegando a apresentar em média 9% de HbF aos 2 anos (PACE & ZEIN, 2006).

A hidroxiuréia (HU) é um agente quimioterápico que diminui a frequência de crises vaso-oclusivas, síndrome torácica aguda e as necessidades transfusionais quando utilizada como terapia para a AF (CHARACHE *et al.*, 1995). O tratamento com esse medicamento é capaz de reduzir a contagem de neutrófilos, uma vez que os altos níveis de células brancas são associados a eventos adversos encontrados em pacientes com anemia falciforme (CASTRO *et al.*, 1994). Dessa forma, a HU vem sendo utilizada com sucesso no tratamento da anemia falciforme e seus efeitos benéficos são atribuídos à habilidade que ela possui em aumentar a produção de hemoglobina fetal (HbF) (CHARACHE *et al.*, 1995). Além disso, alguns estudos sugerem que os mecanismos pelos quais a HU induz o aumento de HbF e reduza a contagem de células brancas é mediado pela inativação de um radical tirosil em ribonuclease reductase (LASSMANN *et al.*, 1992).

Adicionalmente, Rodriguez e cols (1998) relataram que a farmacodinâmica da HU possibilita que ela seja uma doadora de NO e também uma estimuladora da produção de NO devido ao tempo de meia vida de 6 horas. Morris e cols (2001) sugeriram que a HU possa ser oxidada pelo grupo heme e produzir radicais livres da

molécula de NO *in vitro*. Gladwin e cols (2002) relataram que a terapia com HU promove a geração intravascular e intraeritrocitária de NO e é esse aumento o responsável por aumentar os níveis de HbF. Cokic e cols (2003) mostraram que outros dois doadores de NO aumentam a expressão do gene da gama globina em progenitores eritróides. E isto está associado ao aumento dos níveis de GMPc, sugerindo a presença de uma via mediada por NO na indução do gene da gama globina, com conseqüente aumento na síntese de HbF.

### **1.7 O Neutrófilo**

Os neutrófilos são produzidos e armazenados na medula óssea (MO), sendo em seguida liberados para o sangue periférico onde sua meia-vida é de cerca de sete horas. Na MO, a produção de neutrófilos ocorre a partir das células progenitoras multipotenciais, sob ação de numerosos mediadores, em especial os fatores estimuladores de colônias de granulócitos (G-CSF) e granulócitos e monócitos (GM-CSF) (ZAGO *et al.*, 2004).

A principal característica das respostas inflamatórias é representada pelo recrutamento extracelular de células inflamatórias. Entre essas células, a predominância dos neutrófilos é um episódio comum nas inflamações tanto para aquelas que ocorrem como uma conseqüência da invasão tecidual por microrganismos como aquelas relatadas por desordens imunes ou tecidos inespecíficos lesados (HENSON *et al.*, 1987). Essas condições incluem muitas doenças humanas tais como colite ulceral, artrite reumatóide, aterosclerose, doença pulmonária obstrutiva crônica (DPOC) e também algumas dermatites como psoríase ou algumas vasculites. Nessas doenças não-infecciosas, os neutrófilos desempenham um papel crucial no tecido danificado, entretanto, um recrutamento excessivo de células inflamatórias ou ativação de células inapropriadas leva ao desenvolvimento de inflamação crônica e favorece a fibrose e, mais tardiamente, a perda da função orgânica (WEISS *et al.*, 1989).

### **1.8 Mecanismos de adesão de leucócitos**

A adesão de leucócitos aos sítios de inflamação no endotélio envolve um processo de múltiplos passos que é desencadeado pela adesão mediada pela selectina. Essa primeira etapa é instável. A expressão das selectinas no endotélio é induzida pela

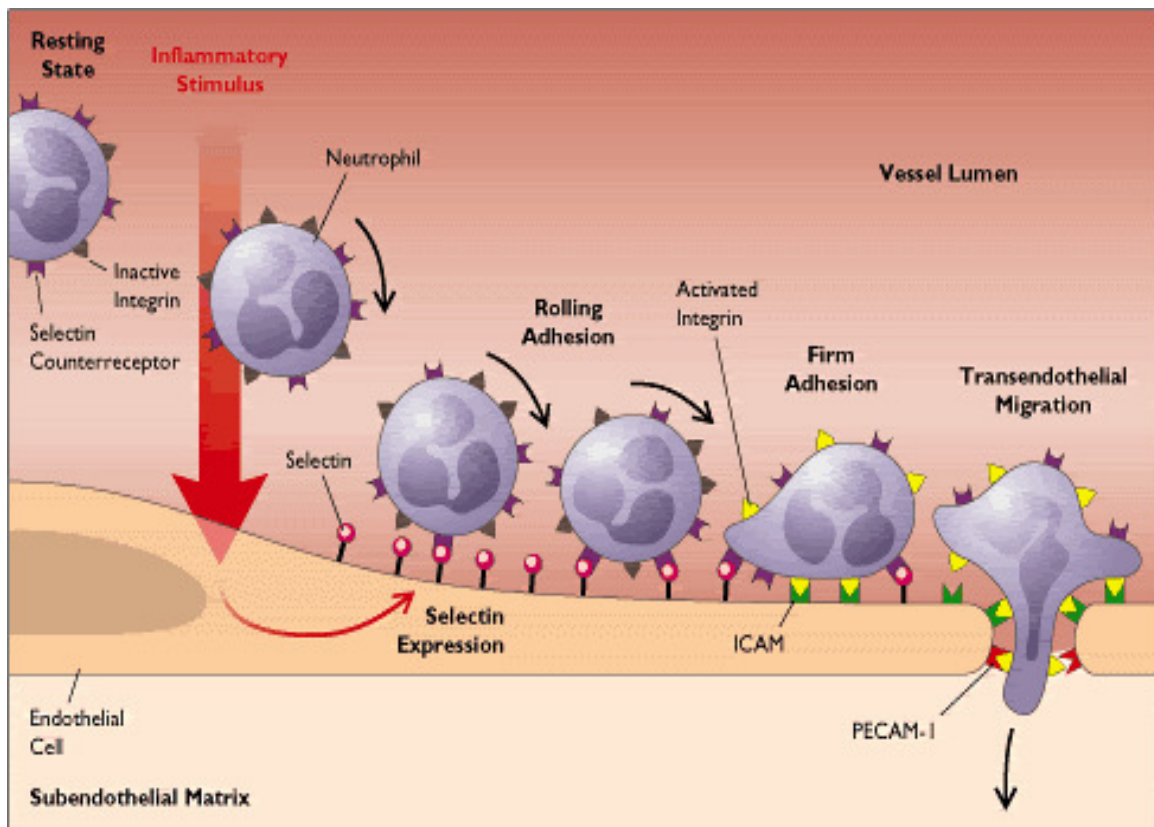
inflamação, e é seguida pela ativação da integrina  $\beta_2$  nos leucócitos induzidos por mediadores inflamatórios produzidos pelo endotélio ou pela camada de tecido inflamado, culminando numa forte adesão da integrina  $\beta_2$  aos seus receptores na parede vascular (BUTCHER, 1991; HYNES & LANDER, 1992).

O neutrófilo expressa uma variedade de moléculas de adesão na sua superfície, facilitando a migração transendotelial da célula. As L e P-selectinas intermedeiam a ligação e rolamento da célula na camada endotelial celular, enquanto que a firme adesão da célula é intermediada principalmente pelas  $\beta_2$  integrinas, Mac-1 (presente em monócitos, macrófagos, granulócitos, neutrófilos, alguma células exterminadoras naturais e linfócitos ativados) e LFA-1 (*lymphocyte function associated antigen-1*: presente em todos os leucócitos) e, por fim, a migração transendotelial é principalmente facilitada pela integrina Mac-1 (ISSEKUTZ *et al.*, 1992). O principal ligante das integrinas Mac-1 e LFA-1 é o receptor endotelial, *intercellular adhesion molecule* (ICAM-1); no entanto, essas integrinas também têm afinidade por outros ligantes encontrados na matriz extracelular, tais como fibronectina (FN), iC3b e fibrinogênio (ASSIS *et al.*, 2004) (Ver Figura 2).

Numerosos intermediários, em especial as citocinas como IL-8, alteram a expressão de integrinas na superfície dos neutrófilos que se ligam firmemente às células endoteliais através de moléculas de ICAM-1. Kasschau e cols (1996) mostraram que os neutrófilos e eritrócitos de pacientes com AF são mais aderentes à fibronectina (FN), além disso, os neutrófilos de pacientes em crise de falcização são mais aderentes à camada endotelial. Um trabalho do nosso laboratório mostrou que a co-incubação dos neutrófilos de pacientes falciformes com IL-8 aumentou a expressão da integrina Mac-1 (ASSIS *et al.*, 2004). Técnicas de microscopia intravital empregando camundongos transgênicos para AF revelaram que os leucócitos podem iniciar o processo vaso-oclusivo. Após um estímulo inflamatório, os leucócitos são recrutados para o endotélio ativado da vênula pós-capilar e subsequentemente formam interações adesivas com os eritrócitos circulantes. A partir daí, os eritrócitos falcizados aderem (tanto para os leucócitos quanto para as células endoteliais), levando à redução do fluxo sanguíneo e finalmente a vaso-oclusão (TURHAN *et al.*, 2002; FRENETTE, 2002). Outro estudo revelou que camundongos transgênicos para AF com deleção P-E selectinas apresentaram redução significativa do recrutamento de leucócitos e diminuição da vaso-oclusão (TURHAN *et al.*, 2002), enfatizando o papel crucial do recrutamento e adesão

dos leucócitos nesse processo. Em camundongos transgênicos para AF, os neutrófilos parecem ser os leucócitos que mais participam no processo vaso-oclusivo (CHIANG *et al.*, 2007).

Em 2004, Canalli e cols relataram aumento no número de eosinófilos em pacientes com AF, além disso, essas células apresentavam aumento nas propriedades adesivas, sugerindo um estado ativado no qual essas células podem vir a participar do fenômeno vaso-oclusivo. Embora recentemente trabalhos tenham sido publicados descrevendo os mecanismos envolvidos na adesão dos neutrófilos e sua participação no processo de vaso-oclusão, se faz necessário uma maior compreensão do papel dos neutrófilos na fisiopatologia da anemia falciforme e suas interações moleculares mediadas pelas moléculas de adesão, bem como possíveis inibidores capazes de atuar diminuindo essa adesão célula-célula.



**Figura 2: Ativação e emigração celular do neutrófilo após estímulo inflamatório (ETZIONI, 2001).** Nas proximidades de uma lesão inflamatória, os neutrófilos aderem-se à parede endotelial, deixam os vasos sanguíneos e movimentam-se ativamente em direção ao foco inflamatório. Este processo envolve várias dezenas ou centenas de moléculas, que são ativadas e desativadas sequencialmente ou movimentadas em diferentes regiões da célula. A ligação e rolamento dessas células à camada endotelial são intermediadas pelas L e P-selectinas enquanto que a firme adesão da célula é intermediada principalmente pelas  $\beta_2$  integrinas, Mac-1 e LFA-1, sendo o principal ligante dessas integrinas o ICAM-1. Na anemia falciforme, há evidências que a ativação e adesão dos leucócitos à parede vascular estejam exacerbadas.

### 1.9 As células vermelhas e a anemia falciforme

As células vermelhas falciformes, diferentemente das células vermelhas normais, aderem aos componentes da parede vascular. Tem sido sugerido que o aumento da aderência das hemácias falciformes ao endotélio pode iniciar e propagar a vaso-oclusão, impedindo o fluxo sanguíneo e assim aumentando o tempo de passagem do sangue pelos capilares. Há hipóteses atualmente demonstrando que a adesão dos leucócitos à parede vascular desencadeia a adesão das células vermelhas ao endotélio e aos leucócitos aderidos. A vaso-oclusão poderia ocorrer, pois o tempo do fluxo de hemácias pelos capilares seria maior do que o tempo necessário para desoxigenação induzindo assim a polimerização da hemoglobina S das hemácias falciformes (ROSSE *et al.*, 2000).

Desde os primeiros estudos *in vitro* Hoover e cols (1979) e Hebbel e cols (1980) demonstraram a aderência de células falciformes realizando cultura de células endoteliais. Essa adesão é mediada principalmente por interações entre receptores nos eritrócitos e nas células endoteliais. Interações têm sido mostradas entre células falciformes, componentes da matriz extracelular e leucócitos (STUART & NAGEL, 2004; CHIANG, 2005). Eritrócitos falciformes têm múltiplas interações adesivas, incluindo ligações ao endotélio, induzindo mudanças patológicas localizadas nas células endoteliais e/ou exposição da matriz subendotelial (NATARAJAN *et al.*, 1996; SOLOVEY *et al.*, 1997). Essas mudanças levam a eventos vaso-oclusivos secundários, possibilitando aos eritrócitos ligar-se a esses novos componentes expostos da matriz extracelular (HILLERY *et al.*, 2000).

Alguns autores acreditam que a adesão das células vermelhas seria na realidade uma consequência da saída prematura de células jovens da medula óssea, que ainda expressam proteínas que são usadas por elas na medula e normalmente não seriam mais encontradas na superfície das células vermelhas maduras circulantes (SUGIHARA *et al.*, 1992; BROWNE & HEBBEL, 1996; ELION *et al.*, 2004). Várias moléculas de adesão são expressas em níveis elevados nas células vermelhas de pacientes AF, sendo as mais estudadas: a integrina VLA-4 (CD49d/CD29; antígeno muito tardio), o CD36 e o BCAM/lu. VLA-4 liga para a VCAM-1 na superfície das células endoteliais e também para fibronectina, um componente da matriz extracelular. O CD36 liga a trombospondina e o fator von Willbrand para as proteínas do endotélio. O BCAM/Lu liga para a laminina na matriz extracelular numa interação dependente de AMPc.

(CONRAN *et al.*, 2009). O tratamento de pacientes com anemia falciforme com HU é associado a uma redução significativa na expressão protéica e gênica de moléculas de adesão como o CD36 e a VLA-4 em hemácias, sugerindo um importante efeito da terapia com hidroxiuréia sobre esses pacientes (GAMBERO *et al.*, 2007).

### **1.10 Anemia falciforme e a inflamação**

A obstrução e a lesão do endotélio vascular e dos tecidos causam uma resposta inflamatória que, por sua vez, resulta em um estado inflamatório crônico nos pacientes com AF, caracterizado por alterações significativas na produção das 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 falciformes (CONRAN *et al.*, 2007; CROIZAT & NAGEL, 1999; DUITTS *et al.*, 1996; LANARO *et al.*, 2009). O aumento dos níveis destas citocinas tem conseqüências fundamentais na fisiopatologia da doença como, por exemplo, na ativação dos leucócitos e das células endoteliais e mudanças na produção e migração de células brancas da medula óssea (PLATT, 2000).

### **1.11 Mediadores inflamatórios e a anemia falciforme**

#### **1.11.1 Interleucina-8 (IL-8)**

Além de estimular a adesão de leucócitos às células endoteliais, as interleucinas têm numerosas outras atividades relacionadas com a ativação dos neutrófilos. A interleucina 8 (IL-8) é ativamente secretada pelas células endoteliais nos locais de inflamação; esta proteína provoca a modificação da conformação das moléculas de integrina na superfície do neutrófilo, promovendo sua ligação com as moléculas receptoras na superfície das células endoteliais, ICAM-1. A IL-8 aumenta a capacidade do neutrófilo de lisar bactérias pela intensificação da fagocitose, geração de superóxido e liberação de grânulos (ZAGO *et al.*, 2004). Além disso, a IL-8 desencadeia a firme adesão do neutrófilo à célula endotelial (LUM *et al.*, 2004), promove sua migração para os tecidos e ativa localmente o seu mecanismo efetor (MUKAIDA, 2000). Estudos mostraram que a estimulação dos neutrófilos com IL-8 (10ng/ml) aumentou a expressão de Mac-1 em neutrófilos de pacientes com AF, indicando que este pode ser uma



possível causa para o aumento da adesão observado nessas células (ASSIS *et al.*, 2005). Recentemente, um estudo na nossa população de pacientes com AF demonstrou um aumento significativo dos níveis de IL-8 (5-60 pg/ml) no plasma desses pacientes (LANARO *et al.*, 2009).

### ***1.11.2 Fator de Necrose Tumoral $\alpha$***

A principal função fisiológica do fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ) é estimular o recrutamento de neutrófilos e monócitos para os sítios de infecção. O TNF- $\alpha$  intermedeia esses efeitos por diversas ações sobre as células endoteliais vasculares e sobre os leucócitos. Esta citocina pró-inflamatória faz com que as células endoteliais vasculares expressem novos receptores de superfície, chamados moléculas de adesão, que tornam a superfície endotelial adesiva para os leucócitos, inicialmente para os neutrófilos e subsequentemente para os monócitos e linfócitos. E também estimula as células endoteliais e os macrófagos a secretarem as citocinas chamadas quimiocinas que induzem quimiotaxia e recrutamento dos leucócitos. Além do seu papel na inflamação, o TNF- $\alpha$  induz a apoptose de alguns tipos celulares (CLARK, 2007). Dados recentes de nosso laboratório demonstraram aumento dos níveis circulatórios de TNF- $\alpha$  (1-7,5 pg/ml) no plasma de pacientes com AF em estado estável. Essa citocina parece apresentar grande importância em diversas doenças inflamatórias que incluem septicemia, artrite reumatóide, e doença crônica, onde essa molécula participa provavelmente da super regulação da cascata de citocinas responsáveis pela inflamação (LANARO *et al.*, 2009).

### ***1.11.3 Fator Estimulador de Colônia de Macrófago-Granulócito (GM-CSF)***

O GM-CSF pertence à família dos receptores de citocinas que caracteriza-se por possuir no domínio extracelular de suas cadeias protéicas dois módulos de cerca de 100 aminoácidos cada, que determina uma estrutura secundária padrão (ZAGO *et al.*, 2004). É um dos fatores de crescimento (glicoproteínas) mais importantes na regulação da hematopoese, atuando em proliferação e diferenciação de células precursoras de eritrócitos, monócitos, eosinófilos e neutrófilos. Sua ação resulta no recrutamento de células-tronco e na proliferação e diferenciação em precursores intermediários comprometidos com mais de uma linhagem. Entretanto, a diferenciação em precursores de linhagem única requer a presença de fatores específicos (GASSON, 1991).

Essa citocina pró-inflamatória também está associada na patogênese de várias doenças do aparelho respiratório e sistema nervoso central. Um aumento dos níveis plasmáticos de GM-CSF (0,05-1,8 pg/mL) em pacientes AF foi reportado recentemente em nossa população de pacientes. Além disso, esse fator parece participar, pelo menos em parte, na leucocitose observada nos pacientes AF (CONRAN *et al.*, 2007).

### **1.12 Fator de transcrição - NFκB**

O fator nuclear, NFκB, da família dos fatores de transcrição, está entre os mais estudados na biologia de vertebrados. Desde sua descoberta na década de 1980, este fator de transcrição tem sido associado em diferentes vias metabólicas, incluindo a inflamação e também a sobrevivência da célula, proliferação e diferenciação. Normalmente, a ativação de NFκB é pró-inflamatória, no entanto, este fator também é antiapoptótico e, portanto um equilíbrio entre as duas funções deve ser rigorosamente regulado. A importância do NFκB na fisiologia humana é enfatizada pelos frequentes casos de doenças nas quais a sua atividade é desregulada (SIMMONDS & FOXWELL, 2008). Além disso, também é importante regulador da tumorigênese (BARKETT & GILMORE, 1999).

O NFκB é induzido no endotélio ativado, resultando na super regulação da expressão das moléculas de adesão na superfície e a produção de mediadores inflamatórios, incluindo citocinas e leucotrienos, fatores vasoconstritores e fatores pró-coagulantes tais como o fator de von Willebrand (vWF), fator ativador de plaquetas (PAF) e fator tecidual (CONRAN & COSTA, 2009). Além disso, dados sugerem que o heme livre é capaz de retardar a apoptose de neutrófilos em humanos *in vitro* em concentrações encontradas durante eventos hemolíticos *in vivo* e esse efeito pode ser modulado através da via do NFκB (ARRUDA *et al.*, 2004).

### **1.13 Nucleotídeos Cíclicos e a adesão dos neutrófilos na anemia falciforme**

Alguns antagonistas fisiológicos alteram a função celular pela ativação das enzimas, adenilato e guanilato ciclases (STEER *et al.*, 1980), que por sua vez produzem aumentos nos níveis intracelulares dos nucleotídeos cíclicos, adenosina monofosfato

cíclico (AMPc) e guanosina monofosfato cíclico (GMPc), respectivamente (MURAD, 1999).

A sinalização via adenilato ciclase é realizada por uma enzima também denominada de adenilil-ciclase, a qual está ligada à membrana citoplasmática da maioria das células e é responsável por formar o AMPc a partir do ATP (fonte de fosfato). O AMPc atua como segundo mensageiro intracelular, e intermedeia respostas hormonais, a neurotransmissores, ou a fármacos, que interagem primariamente com seus receptores (GOODMAN & GILMAN, 1996).

A intensidade e duração da resposta inflamatória são controladas pelo AMPc dependente de proteína quinase A (PKA). Níveis elevados de AMPc ativa PKA, a qual fosforila algumas proteínas citoplasmáticas com conseqüente regulação da quimiotaxia, degranulação e metabolização oxidativa neutrofílica. Além disso, a PKA estimula a expressão gênica da fosfodiesterase (PDE4) aumentando a síntese desta enzima, capaz de transformar AMPc em AMP inativo (BRUNO *et al.*, 2004). Muitos estudos têm demonstrado que o AMPc protege os neutrófilos contra fator de necrose tumoral (TNF $\alpha$ ) que induz a apoptose. Um dos mecanismos que podem levar a uma maior sobrevivência dos neutrófilos é através da estimulação de adenilato ciclase por prostaglandinas, por exemplo, aumentando assim a produção de AMPc (KRAKSTAD *et al.*, 2004). Além disso, a ação da prostaglandina 2 (PGE2) tem sido associada a indução da produção de HbF, em sangue periférico derivado de colônia de eritrócitos, um mecanismo que pode ser regulado pela sinalização dependente de AMPc (KUROYANAGI *et al.*, 2006; KEEFER *et al.*, 2006). Dados recentes indicam que a super regulação da sinalização dependente de AMPc desempenha um papel importante nas alterações das propriedades adesivas e migratórias dos neutrófilos de pacientes com AF. Tais alterações podem ter implicações importantes para a fisiopatologia da doença e a regulação de AMPc dependente da atividade da PKA pode representar um importante alvo terapêutico para evitar a alteração da função dos leucócitos (CANALLI *et al.*, 2007).

O GMPc por sua vez é produzido a partir da guanosina trifosfato (GTP) pela enzima citoplasmática guanilato ciclase (GC), e ativa a via da proteína quinase G (PKG) dependente de GMPc liberando o K<sup>+</sup> e inibindo o influxo de Ca<sup>++</sup> intracitoplasmático, levando à diminuição de Ca<sup>++</sup> e ao desligamento da miosina/actina e promovendo o relaxamento da musculatura lisa. O GMPc pode apresentar efeitos antiinflamatórios e

atua diminuindo as propriedades adesivas de alguns tipos de células como os leucócitos e células endoteliais (De CATERINA *et al.*, 1995; IGNARRO, 2002; CONRAN *et al.*, 2003). O óxido nítrico intermedeia muito dos seus efeitos pela ativação de GC e conseqüente elevação do GMPc, entretanto os níveis dos nucleotídeos cíclicos são diminuídos por degradação pelas enzimas fosfodiesterases (MURAD, 1999). Os alvos moleculares principais dos nucleotídeos cíclicos em neutrófilos são as proteínas quinases dependentes em nucleotídeos cíclicos que intermedeiam seus efeitos através da fosforilação de substratos específicos (EIGENTHALER *et al.*, 1992). Por sua vez, sabemos que o nucleotídeo cíclico, GMPc, tem papel inibidor na adesão de leucócitos (CONRAN *et al.*, 2001; AHLUWALIA *et al.*, 2004).

#### **1.14 Drogas moduladoras da via de sinalização de AMPc**

As prostaglandinas 1 e 2 são moléculas ativadoras de adenilato ciclase. Pertencem a uma classe de mediadores inflamatórios lipídicos derivados do ácido araquidônico, de muitos tipos celulares, pela via ciclooxigenase. Nosso grupo de estudo demonstrou o aumento de PGE2 no plasma de pacientes AF em estado estável (CONRAN *et al.*, 2007; LANARO *et al.*, 2009) embora o aumento dos níveis de PGE2 já tivesse sido relatado em pacientes AF durante a crise e pós-crise (GRAIDO-GONZALEZ *et al.*, 1998). Similarmente, PGE1 (prostaglandina 1) também foi observada em níveis aumentados no plasma da nossa população de pacientes AF sugerindo que esse aumento pode ser um dos fatores da elevação de AMPc observada nos neutrófilos desses pacientes (CONRAN *et al.*, 2007). A PGE1 é geralmente considerada como um agente vasodilatador sendo utilizada algumas vezes para o tratamento de hipertensão e doenças arteriais. Entretanto, efeitos paradoxais desta molécula têm sido relatados e, embora a PGE1 pareça inibir o início da inflamação, este agente também pode promover ou aumentar os efeitos dos mediadores inflamatórios (UCHIDA *et al.*, 2003). Embora a PGE2 seja conhecida como mediador inflamatório, particularmente importante em doenças como artrite reumatóide e osteoartrose, na anemia falciforme, esta molécula pode apresentar efeitos favoráveis e desfavoráveis. A PGE2 intermedeia alguns dos seus efeitos através do aumento da regulação de AMPc dependente da atividade da proteína quinase (SUGIMOTO *et al.*, 2007).

A forskolina é uma droga ativadora de adenilato ciclase. Muitos dos seus efeitos biológicos são devido à ativação da adenilato ciclase e o resultado é o aumento da

concentração intracelular de AMPc (SEAMON *et al.*, 1983). O 8-bromo adenosina monofosfato cíclico (8-br-AMPc) é um análogo de AMPc e apresenta uma melhor resistência a hidrólise pelas fosfodiesterases do que o AMPc. Ele é capaz de ativar a proteína quinase A, bem como, inibir o crescimento celular, diminuir a proliferação celular, aumentar a diferenciação e induzir a apoptose de células de cultura (MEYER & MILLER, 1974; HEI *et al.*, 1989).

### **1.15 Drogas moduladoras na via de sinalização de GMPc**

O GMPc é o segundo mensageiro principal do NO. A modulação dos níveis intracelulares de GMPc pode representar um alvo terapêutico para o tratamento da doença falciforme (ALMEIDA *et al.*, 2008). Alguns fármacos ou drogas atuam diretamente ou indiretamente na via NO/GMPc. Os doadores exógenos de NO, o nitroprussiato de sódio (SNP) e DEANO (Dietilamina-NONOato), atuam aumentando a concentração de GMPc intracitoplasmático. A sinalização dependente de GMPc pode ser um importante indutor de HbF e exercer funções antiinflamatórias nos neutrófilos (IKUTA *et al.*, 2001; COKIC *et al.*, 2003). Uma importante classe de drogas moduladoras de nucleotídeos cíclicos é a das drogas inibidoras das enzimas fosfodiesterases (PDEs); a inibição de fosfodiesterases, que regulam GMPc intracelular, pode resultar em elevação de GMPc em tecido-específicos (IGNARRO, 2002).

Na investigação de novas drogas para essas vias, os estimuladores independentes de NO e os ativadores da GCs representam grande inovação na pesquisa. O BAY41-2272 (Figura 3) é um ativador da GCs e produz um potente relaxamento de artérias e veias coronárias e sistêmicas e também reduz a pressão da reperfusão coronária em coração de ratos. Esse componente também tem propriedades antiproliferativas na musculatura lisa e efeitos anti-agregatórios nas plaquetas (EVGENOV *et al.*, 2006). Além disso, o BAY41-2272 é capaz de inibir a expressão de P-selectina em plaquetas e nas células endoteliais *in vitro* e reduzir o rolamento e a adesão dos leucócitos *in vivo*, indicando a capacidade dessa droga de modular a resposta inflamatória (AHLUWALIA *et al.*, 2004).

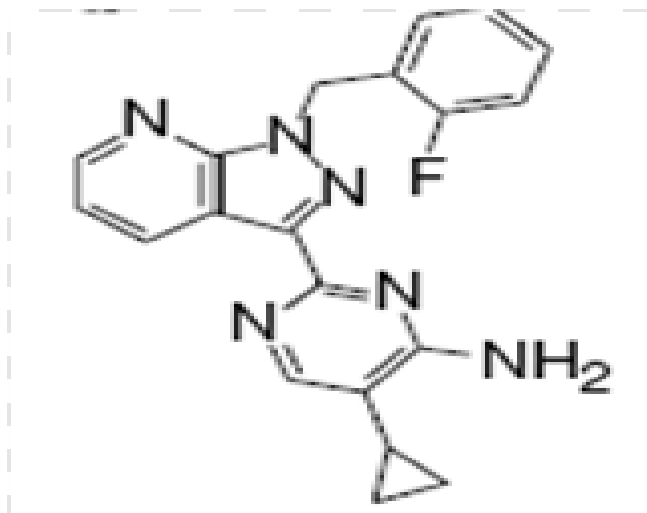
O BAY73-6691 (Figura 4) é um inibidor da enzima fosfodiesterase 9A (PDE9A), uma enzima altamente expressa em células hematopoéticas, a qual regula níveis de GMPc intracelular (ALMEIDA *et al.*, 2008). Este inibidor também está sendo

utilizado para o tratamento da doença de Alzheimer, através da inibição da PDE9A, também expressa no cérebro, e tem sido sugerido como uma terapia para melhorar a consolidação da memória através da via de sinalização NO/GMPc e está em fase de ensaios pré-clínicos (WUNDER *et al*, 2005). A enzima PDE9A é expressa em reticulócitos e neutrófilos de humanos, com uma expressão ainda maior nestas células de pacientes com anemia falciforme. A inibição *in vitro* dessa enzima em células da linhagem eritróide e em leucócitos induz o aumento da expressão do gene *HBG* e diminui as propriedades adesivas. A distribuição relativamente limitada dessa proteína nos tecidos sugere que ela poderia representar um alvo para novas drogas necessitando de mais estudos para avaliar se a sua inibição traria benefícios aos pacientes com anemia falciforme (ALMEIDA *et al.*, 2008).

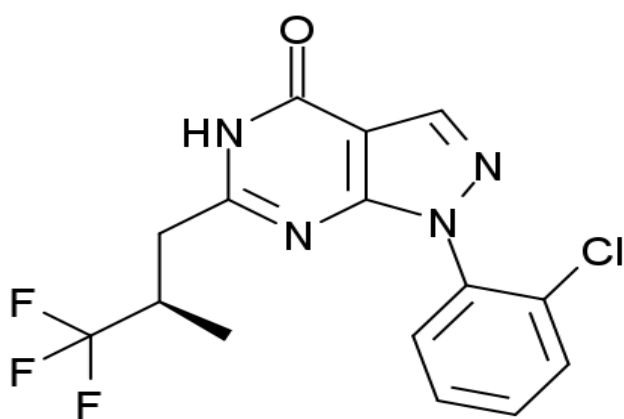
#### **1.16 Justificativa**

Tendo em vista que vários fatores contribuem para a vaso-oclusão na AF, a qual é a principal causa de morbidade nesses pacientes, se faz necessário uma melhor elucidação dos mecanismos envolvidos no processo vaso-oclusivo, bem como a melhor compreensão do papel do estado inflamatório crônico nesta doença. Apesar de parecer conceitualmente simples, os mecanismos relacionados à vaso-oclusão na anemia falciforme são complexos e ainda não completamente esclarecidos. Dessa forma, é de fundamental importância o desenvolvimento de novos estudos com o intuito de encontrar possíveis alternativas e alvos terapêuticos para prevenir ou diminuir o processo vaso-oclusivo.

**Figura 3: Estrutura química do BAY 41-2272**



**Figura 4: Estrutura química do BAY 73-6691**



## **2    OBJETIVOS**

### **2.1    Objetivos Gerais**

Este estudo teve como objetivo avaliar os efeitos *in vitro* das citocinas e outras moléculas inflamatórias nas propriedades adesivas de neutrófilos e células vermelhas de indivíduos controle e de pacientes com AF. Adicionalmente, foram comparados os efeitos do BAY 73-6691, um inibidor da enzima hidrolizante de GMPc, fosfodiesterase 9A (PDE9A) e BAY 41-2272, um ativador de guanilato ciclase, na ausência ou presença da estimulação pelas citocinas na adesão dessas células.

### **2.2    Objetivos Específicos**

1. Comparação das propriedades adesivas basais de neutrófilos de indivíduos saudáveis (controle) e pacientes com AF; avaliação das propriedades adesivas destas mesmas células após tratamentos com agentes que elevam níveis de AMPc intracelular, forskolina (ativador de adenilato ciclase), 8-br-AMPc (análogo de AMPc) e prostaglandinas 1 e 2 (ativadores direto de AMPc) e após tratamento com diferentes concentrações de mediadores inflamatórios: IL-8, TNF- $\alpha$  e GM-CSF, utilizando-se ensaio de adesão estático.
2. Avaliação da adesão de células vermelhas (controle e AF) após tratamento com diferentes concentrações de mediadores inflamatórios, IL-8 e TNF- $\alpha$  e após tratamento simultâneo com os mediadores inflamatórios e as drogas moduladoras de nucleotídeos cíclicos: BAY 73-6691 (inibidor da enzima PDE9A) e BAY-41-2272 (ativador de GC), utilizando-se ensaio de adesão estático.
3. Avaliação da adesão de neutrófilos (controle e AF) após tratamento com BAY 73-6691 e BAY 41-2272 e após tratamento simultâneo com os mediadores inflamatórios (IL-8, TNF- $\alpha$  e GM-CSF) e drogas moduladoras de nucleotídeos cíclicos: BAY73-6691 e BAY41-2272, utilizando-se ensaio de adesão estático.
4. Avaliação da adesão de neutrófilos (controle e AF) após tratamento com um inibidor de NF $\kappa$ B (fator de transcrição) e também após tratamento simultâneo com mediadores inflamatórios (IL-8, TNF- $\alpha$  e GM-CSF) e o inibidor de NF $\kappa$ B, utilizando-se ensaio de adesão estático.



5. Avaliação da expressão celular das integrinas LFA-1, Mac-1 e L-selectina na superfície celular dos neutrófilos (controle e AF) utilizando a técnica de citometria de fluxo.

## **CASUÍSTICA E ASPECTOS ÉTICOS**

---

### **3 CASUÍSTICA E ASPECTOS ÉTICOS**

*Médicos responsáveis pelos pacientes: prof. Dr. Fernando Ferreira Costa, prof<sup>a</sup> Dra Sara T. O. Saad, Dra Fabíola Traina e Dr. Kleber Y. Fertrin*

Pacientes homozigotos para HbS atendidos no Hemocentro da UNICAMP foram selecionados para esse trabalho. A comprovação de diagnóstico foi realizada através de eletroforese de hemoglobina e cromatografia líquida de alta pressão (HPLC) (VARIANT<sup>TM</sup>; Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EUA). Foram coletados aproximadamente 10 mL de sangue periférico, para a separação de neutrófilos, de um grupo de voluntários sadios (masculinos e femininos) e pacientes com AF (masculinos e femininos).

O grupo de pacientes com anemia falciforme (N=41) foi composto por pacientes sem terapia com HU, com idades entre 17-65 anos e apresentavam-se em fase estável, ausência de crises de dor, infecções e transfusões prévias por pelo menos 3 meses anteriores à data da coleta das amostras. O grupo de voluntários sadios (N=47) foi composto por alunos/funcionários da UNICAMP, com idades entre 18-55 anos. Todos os indivíduos, voluntários e pacientes, assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), não sendo oferecida nenhuma compensação financeira pela participação neste estudo. Os dados clínicos dos participantes estão na Tabela 2.

#### **3.1 Aspectos éticos da pesquisa**

Este trabalho de pesquisa foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Faculdade de Ciências Médicas (FCM) da UNICAMP e aprovado sob o nº 761/2006, homologado em 23 de janeiro de 2007. O TCLE assinado por todos os participantes desse estudo, também foi aprovado pelo conselho citado.

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

---

## **4 MATERIAIS E MÉTODOS**

### **4.1 Material**

As citocinas, IL-8 recombinante humana (CXCL8), o TNF- $\alpha$  e o GM-CSF, foram adquiridos da R&D Systems (Minneapolis, USA). A fibronectina (FN) foi adquirida da Invitrogen (Califórnia, USA). Os anticorpos CD11a, CD11b e CD62L foram obtidos da BD Biosciences (Califórnia, USA). Todos os outros produtos foram obtidos da Sigma Co. (St. Louis, USA).

### **4.2 Separação de Neutrófilos**

Sangue total (6 mL) foi colhido em tubo contendo o anticoagulante citrato de sódio 3,2% (VACUPLAST, Huangyn, China), utilizando o primeiro método descrito por English e Andersen (1974). Em resumo, estas amostras foram colocadas sobre 2 camadas de Ficoll-Paque de densidades 1.119 e 1.077 g/L, respectivamente. Após centrifugação de 700 g por 30 minutos, os neutrófilos foram retirados com uma pipeta *Pasteur*, lavados uma vez em solução de salina tamponada (PBS, pH 7,2). Uma solução de amônia (155mM NH<sub>4</sub>CL, 10mMKHCO<sub>3</sub>) foi utilizada para lisar os eritrócitos contaminantes. Os neutrófilos foram lavados mais uma vez com PBS e ressuspensos em meio RPMI 1640 (pH 7,2) numa concentração de  $2 \times 10^6$  células/mL. As células foram mantidas à 4°C até o prosseguimento do experimento.

### **4.3 Contagem dos neutrófilos no sangue periférico**

A contagem das células foi feita através de uma câmara de Neubauer e posteriormente foram realizados os cálculos a partir dos neutrófilos contados para deixá-los na concentração desejada do experimento ( $2 \times 10^6$  células/mL).

### **4.4 Tratamento de neutrófilos com mediadores inflamatórios, drogas moduladoras de nucleotídeos cíclicos e fator de transcrição**

Os neutrófilos foram co-incubados com vários mediadores inflamatórios e drogas durante os experimentos de ensaio de adesão.

As prostaglandinas 1 e 2 foram solubilizadas em PBS e mantidas em uma concentração estoque de 2,8 mM e armazenadas à -20°C. Na padronização dos ensaios de adesão foram utilizadas as seguintes concentrações: 10 µM e 50 µM.

A forskolina foi solubilizada em DMSO (dimetilsulfóxido, Merk, KGaA, Darmstadt, Germany) e mantida em uma concentração de 24 mM e armazenada à -20°C. Na padronização dos ensaios de adesão foram utilizadas as seguintes concentrações: 10 µM, 20 µM e 50 µM.

O 8-br-AMPC foi solubilizado em PBS e mantido em uma concentração de 10 mM e armazenado à -20°C. Na padronização dos ensaios de adesão foram utilizadas as seguintes concentrações: 1 µM, 10 µM, e 100 µM.

Os mediadores inflamatórios IL-8, TNF-α e GM-CSF foram solubilizados em PBS e mantidos em uma concentração de 50 µg/ml, 50 µg/ml e 100 ng/ml respectivamente e armazenados à -20°C. Na padronização dos ensaios de adesão foram utilizadas as seguintes concentrações: IL-8, 10 ng/ml, 100 ng/ml e 500 ng/ml; TNF-α, 10 ng/ml, 50 ng/ml e 100 ng/ml e o GM-CSF, 0,1ng/ml, 1 ng/ml e 10 ng/ml.

As drogas moduladoras de nucleotídeos cíclicos, BAY73-6691 (Sigma Co. St. Louis, USA) e BAY41-2272 (doador gentilmente pelo Dr. Edson Antunes, Universidade Estadual de Campinas, Brasil), foram solubilizadas em DMSO e mantidas em uma concentração de 4mM e 1mM, respectivamente e armazenadas à -20°C. As concentrações utilizadas nos ensaios de adesão/citometria de fluxo foram: BAY 73-6691: 60 µM e BAY 41-2272: 60 nM-150 nM.

O inibidor de NFκB foi solubilizado em meio RPMI e mantido em uma concentração de 10 µM e armazenado à -20°C. A concentração utilizada no ensaio de adesão foi 400 nM.

Todos os ensaios de adesão de neutrófilos, os quais foram incubados com drogas solubilizadas com DMSO, foram comparados com uma adesão basal de neutrófilos incubados apenas com DMSO na proporção de 0,2 % v/v.

#### **4.5 Ensaio de adesão estático de neutrófilos**

O ensaio de adesão foi realizado através de placas com 96 poços recém preparados por *coating* individual nos poços com 50 µl de fibronectina (20 µg/ml) à

4°C overnight. Os poços foram lavados três vezes com 160 µl/poço de PBS antes do bloqueio dos sítios inespecíficos com 100 µl/poço de 0,5% de BSA (albumina sérica bovina) por 90 minutos à 37°C. Mais três vezes lavagens foram feitas antes de colocar a placa para secar com PBS. Os neutrófilos ressuspensos em RPMI ( $2 \times 10^6$  células/mL) foram preparados na presença ou ausência de mediadores inflamatórios e/ou drogas moduladoras de nucleotídeos cíclicos, cujas concentrações foram escolhidas após uma revisão da literatura. Em seguida, os neutrófilos tratados (50 µl/poço) foram semeados em triplicata nos poços revestidos e as células foram submetidas a adesão à FN por 30 minutos à 37°C, 5% de CO<sub>2</sub>. Após o tempo de incubação, as células não aderentes foram desprezadas lavando-se mais três vezes com PBS a placa. Foram adicionados 50 µl de RPMI em cada poço contendo os neutrófilos tratados. Para cada amostra foi preparada uma curva padrão em placas não revestidas com FN, semeadas em duplicata (50 µl/poço) com diluições a partir da concentração original ( $2 \times 10^6$  neutrófilos/mL); 5%, 10%, 20%, 50% e 100%. Para todos os experimentos foi realizada uma adesão basal (ausência de drogas) para cada amostra de controle e pacientes. As placas foram congeladas e armazenadas *overnight* (-20°C).

#### **4.6 Leitura do Ensaio de Adesão**

Após o descongelamento da placa foi adicionado 100 µl/poço de HTAB (*hexadecyltrimethyl ammonium bromide*) em cada poço e após a homogeneização foi retirado 20 µl/poço desta mistura e colocado em outra placa. Por fim, adicionou-se 180 µl/poço de uma solução previamente preparada contendo 45 mL de H<sub>2</sub>O, 5 mL de *Potassium phosphate buffer*, 8,35 mg de *o-dionisidine dihydrochloride* e 25 µl de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1%. Após 5 minutos, foi realizada a leitura da placa de adesão através de Leitor de Elisa a 492nm (Multiscan MS, Labsystems, EUA). A adesão dos neutrófilos foi calculada pela densidade óptica dos resíduos da mieloperoxidase contida nos grânulos dos neutrófilos. A porcentagem de células aderentes foi calculada por comparação das absorbâncias das amostras desconhecidas com as da curva padrão.

#### **4.7 Separação de Células Vermelhas**

Amostras de sangue periférico foram coletadas em tubo com citrato de sódio e centrifugadas por 10 minutos à 500g para remoção do plasma e *buffy coat*. As células

foram lavadas 3 vezes sendo ressuspensas em PBS (salina fosfatada tamponada) e centrifugadas à 700g, 600g e 480g respectivamente, sendo então, ressuspensas em 1 mL de PBS para contagem das células vermelhas no contador automático Cell-Dyn 1700(ABBOT, IL, USA). A concentração final foi ajustada para  $2 \times 10^8$  cel/mL.

#### **4.8 Contagem das células vermelhas no sangue periférico**

A contagem de células vermelhas dos pacientes com anemia falciforme e indivíduos controles foi realizada utilizando o sistema automático de contagem diferencial de células Advia Hematology System (Bayer Corp., Dublin, Ireland).

#### **4.9 Ensaio de adesão estático das células vermelhas**

Placas com 96 poços de fundo plano foram preparados por *coating* individual com 60 µL de fibronectina (20 µg/mL de FN em PBS) *overnight* à 4 °C. Os poços da placa foram lavados três vezes com 100 µL de PBS. Os sítios inespecíficos foram bloqueados com 150 µL de PBS/BSA a 1% por 90 minutos à 37 °C. Os poços foram lavados novamente por mais três vezes com 100 µL de PBS. Depois de secos, adicionamos em 3 poços na placa, um volume de 50 µL da solução celular contendo  $2 \times 10^8$  cel/mL células vermelhas para a adesão basal e células vermelhas tratadas em concentração de  $2 \times 10^8$  cel/mL, com os componentes estudados, em meio Hank's Balanced Salt Solution (HBSS; GIBCO BRL, Life Technologies).

A incubação foi realizada por um tempo de 30 minutos, que foi estabelecido como tempo ideal para que as células respondam aos estímulos causados pelos componentes estudados, à 37 °C, 5% CO<sub>2</sub>. Após a incubação, os poços foram lavados gentilmente por três vezes com 100 µL de PBS, para que as células não aderentes fossem desprezadas. Por fim foi adicionado 50 µL de meio HBSS em cada poço, para evitar que as células aderidas sofressem desidratação.

Para mensurar a quantidade de células vermelhas que aderiram à FN, foi realizada uma curva padrão. Para construir a curva, foi adicionado, em duplicata, concentrações em porcentagem de 0, 5, 8, 10, 20, 50, 80 e 100% da suspensão original



de células ( $2 \times 10^8$  células/mL), onde o 0% era formado apenas de meio HBSS e o 100% apenas de solução original de células. A solução de revelação utilizada no ensaio de adesão é a solução de DRABKIN (Sigma Chem. Co., St Louis, USA), que é um reagente muito utilizado na rotina hematológica, contendo cianeto e ferrocianeto de potássio. Esse reagente tem a propriedade de lisar as células vermelhas e expor a hemoglobina presente nessas células. Após isso há a oxidação da hemoglobina e metahemoglobina em cianometahemoglobina. A intensidade de cor desse composto se mede colorimetricamente, permitindo assim a leitura em comprimento de onda de 540nm.

A cada poço (reação de adesão e curva padrão) foi adicionado 50  $\mu$ L da solução de DRABKIN. Após 5 minutos de incubação à 37°C, a leitura da placa foi realizada em leitor de ELISA a 540nm (Multiscan MS, Labsystems, EUA). A aderência foi calculada por comparação da absorbância das amostras desconhecidas com a absorbância da curva padrão que apresentavam concentrações celulares conhecidas.

#### **4.10 Tratamento das células vermelhas com mediadores inflamatórios, drogas moduladoras de nucleotídeos cíclicos e fator de transcrição**

As hemácias foram co-incubadas com vários mediadores inflamatórios e drogas durante os experimentos de ensaio de adesão.

Os mediadores inflamatórios IL-8 e TNF- $\alpha$  foram utilizados nas seguintes concentrações: IL-8, 10 ng/ml, 100 ng/ml e 500 ng/ml e TNF $\alpha$ , 10 ng/ml, 50 ng/ml e 100 ng/ml.

As drogas moduladoras de nucleotídeos cíclicos, BAY73-6691 e BAY41-2272, foram utilizadas nos ensaios de adesão nas concentrações; 60  $\mu$ M BAY 73-6691 e 60 nM/150 nM BAY 41-2272

Todos os ensaios de adesão de hemácias, as quais foram incubadas com drogas solubilizadas com DMSO, foram comparados com uma adesão basal de hemácias incubadas apenas com DMSO na proporção de 0,2 % v/v.

#### 4.11 Citometria de fluxo

A técnica de citometria de fluxo consiste no reconhecimento de proteínas *in situ*, com um anticorpo marcado com um fluorocromo, comumente ficoeritrina (PE) ou fluoresceína isotiocinato (FITC). Este fluorocromo ao ser estimulado por um feixe de laser emite um fóton que é captado por sensores no aparelho. O citômetro de fluxo faz análises tanto qualitativas (quantas células expressam este produto ) como quantitativas (quanto de certo produto é expresso por célula ), da mesma amostra (OWENS *et al.*, 1995).

A expressão das moléculas de adesão na superfície dos neutrófilos de pacientes com anemia falciforme e de indivíduos controles foi detectada através da citometria de fluxo. Os neutrófilos isolados ( $2 \times 10^6$  células/mL) foram incubados com os mediadores inflamatórios (IL-8, TNF $\alpha$  e GM-CSF) na presença e/ou ausência de BAY 73-6691 e BAY-41-2272 (60 minutos, 37°C) antes de incubar 100  $\mu$ L das células com a concentração de saturação de anticorpo monoclonal anti-CD11a conjugado RPE, anticorpo monoclonal anti-CD11b conjugado Alexa Fluor e anticorpo monoclonal anti-CD62L conjugado PE. Após incubar as células com os anticorpos por 30 minutos em temperatura de geladeira, foram adicionados 500 $\mu$ L de PBS em cada tubo e em seguida a centrifugação das células (1500 rpm, 5 minutos). O sobrenadante foi removido após a centrifugação e as células foram fixadas com paraformaldeído (1%) para serem analisadas no dia seguinte. As células foram analisadas a 488nm em um FACScalibur Becton-Dickinson. SSC/FSC (*side scatter/forward scatter*), *dot plots* foram usados para identificar a população de neutrófilos. A intensidade da fluorescência de cada célula foi comparada com as células incubadas com um controle de isotipo negativo para quantificar a expressão das subunidades das moléculas de adesão.

O controle negativo utilizado foi um anticorpo monoclonal de coelho anticamundongo conjugado com FITC e R-PE. Os resultados foram expressos como intensidade média de fluorescência (MFI) que demonstra a quantidade, em unidades de fluorescência de cada subunidade de integrina expressa na superfície de cada célula, relativa às células incubadas com o anticorpo controle negativo.

#### **4.12 Análise dos dados**

Os dados foram expressos pelas médias  $\pm$  erro da média (SEM) de  $N$  de indivíduos. As médias foram comparadas, depois do tratamento com drogas, utilizando o teste paramétrico *ANOVA “repeated measures”* e os dados de cada grupo foram comparados utilizando o teste *Bonferroni Multiple Comparisons Test*. Todos os cálculos foram efetuados utilizando-se o programa GraphPad Instat.

## **RESULTADOS**

---

## 5 **RESULTADOS**

### 5.1 Aspectos clínicos dos indivíduos controles e pacientes que participaram do estudo

Todos os pacientes que participaram deste estudo foram submetidos a exames clínicos, e os dados hematológicos como o hemograma e quantificação de HbF, estão representados na TABELA 2.

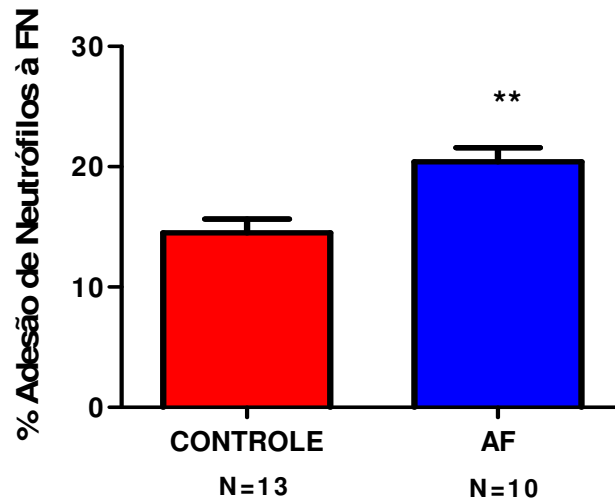
**Tabela 2 Aspectos clínicos dos controles AA e pacientes SS que participaram deste estudo**

	<b>AA</b>	<b>SS</b>
<b>Masculino/Feminino</b>	29/12	15/32
<b>Idade (anos)</b>	34 (32; 18; 55)	37 (38; 17; 65)
<b>Contagem total de células vermelhas (<math>10^6</math> / <math>\mu</math>l)</b>	N/D	2,8 (2,7; 1,6; 5,1)
<b>Hematócrito (%)</b>	44 (43; 39; 50)	24,6 (24,5; 15,6; 33,6)
<b>Hemoglobina (g/L)</b>	N/D	8,2 (8,2; 5,6; 10,6)
<b>Volume Corpuscular Médio (fl)</b>	N/D	89,3 (91,1; 64,8; 105,1)
<b>Hemoglobina Corpuscular Média (pg)</b>	N/D	29,8 (30,1; 20,5; 36,4)
<b>WBC (<math>\times 10^9</math>/L)</b>	N/D	10,5 (10,2; 3,9; 18,2)
<b>Plaquetas (<math>\times 10^9</math>/L)</b>	N/D	457,9 (463; 190,5; 1325)
<b>HbF (%)</b>	N/D	7,5 (6,2; 0,5; 19,7)

AA, indivíduos controles; SS, pacientes com AF sem terapia com HU; HbF, hemoglobina fetal; N/D, não determinado. Resultados clínicos estão expressos na média (mediana, mínimo e máximo), exceto os gêneros (masculino/feminino).

## 5.2 Adesão de neutrófilos controle e de pacientes com AF à FN *in vitro*

Os neutrófilos ( $2 \times 10^6$  células/mL) de pacientes com AF apresentaram uma capacidade significativamente maior de aderirem à fibronectina (FN; 20µg/ml) em relação aos neutrófilos de indivíduos controle, como representado na Figura 5.



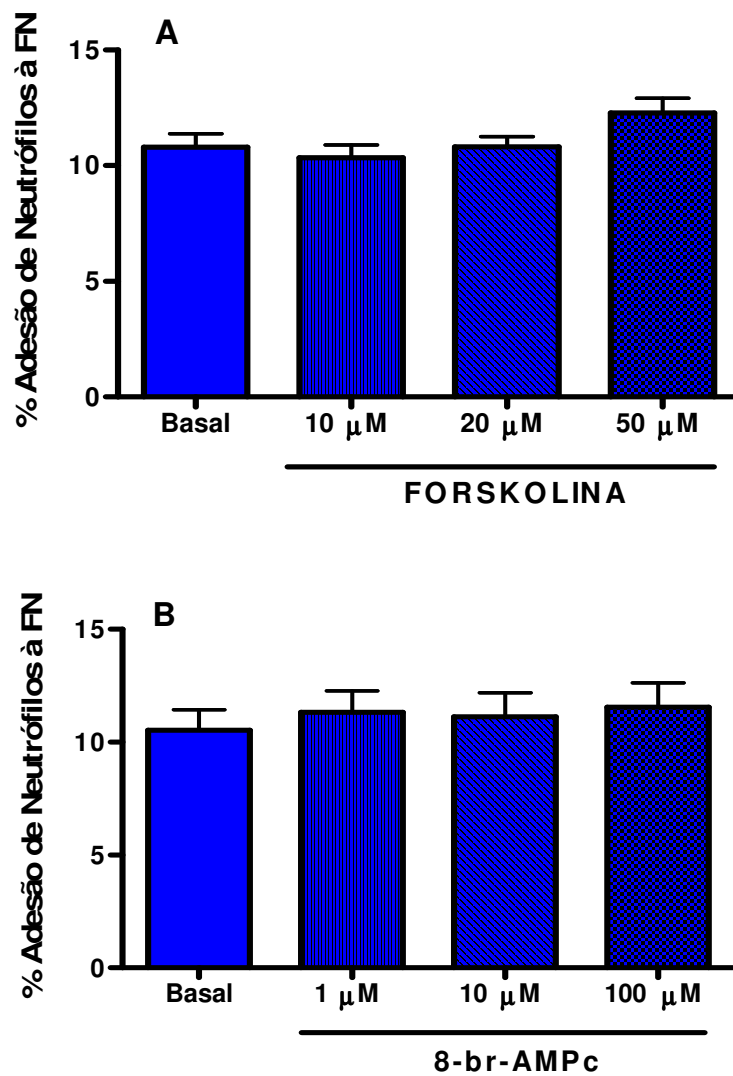
**Figura 5:** Adesão de neutrófilos de indivíduos saudáveis (controles) e pacientes com AF (AF) à fibronectina (FN; 20µg/ml) (30 min, 37°C, 5% CO<sub>2</sub>). \*\* p<0.01, comparado com o controle; *Test Mann Whitney*

### **5.3 Efeito de ativadores da via AMPc nas propriedades adesivas de neutrófilos controles e AF *in vitro***

Trabalhos prévios do nosso grupo têm indicado um aumento nos níveis intracelulares de AMPc em neutrófilos de pacientes com AF (neutrófilos AF) e que a inibição da via dependente em AMPc pode ser útil para diminuir a adesão de neutrófilos AF (CANALLI *et al.*, 2007; CONRAN *et al.*, 2007). Mediante ao exposto, foi verificado se agentes que sabidamente aumentam níveis intracelulares de AMPc eram capazes de aumentar a adesão de neutrófilos, *in vitro*.

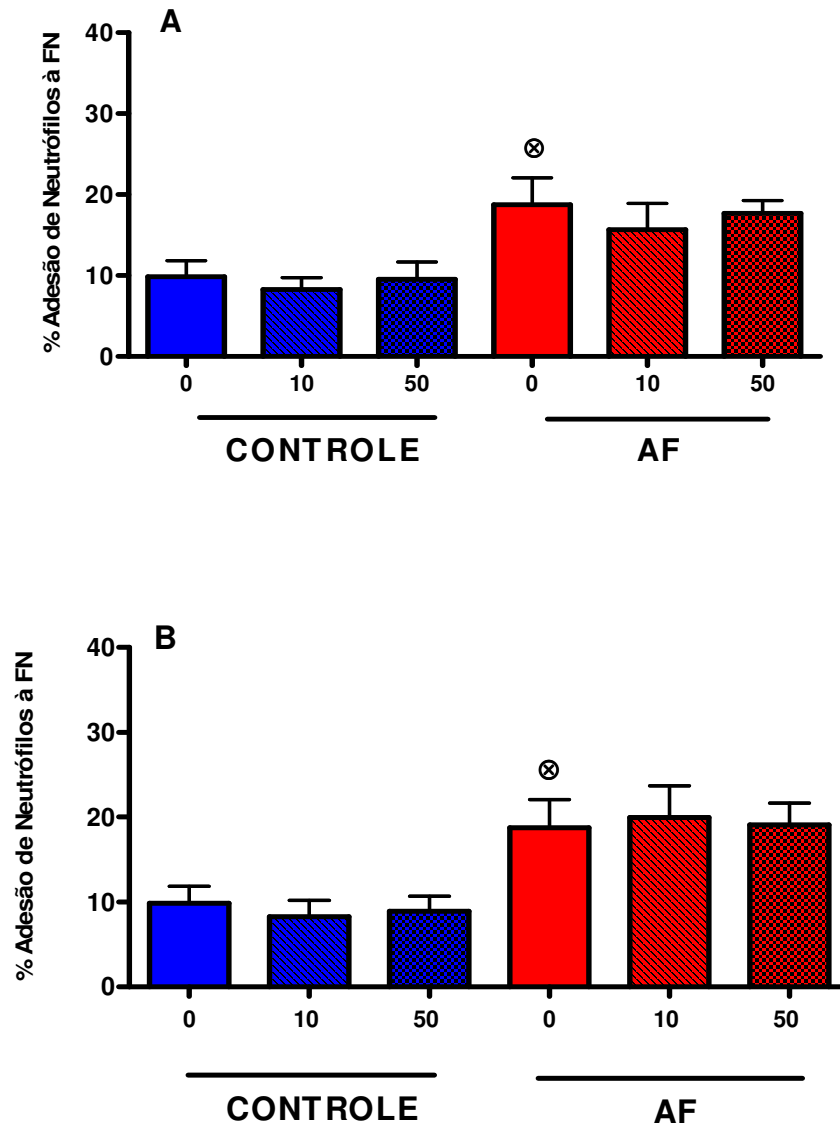
Foram realizados ensaios de adesão *in vitro* à FN (20 µg/ml) de neutrófilos controle na presença de forskolina, um ativador de adenilato ciclase, e de 8-bromo adenosina monofosfato cíclico (8-br-AMPc), um análogo de AMPc. Alterações significativas nas propriedades adesivas de neutrófilos controle não foram observadas, tanto na presença de forskolina (10-50µM) (Figura 6A) quanto com 8-br-AMPc (1-100 µM ) (Figura 6B).

Adicionalmente, neutrófilos controle e de pacientes com AF, foram incubados com PGE1 (10-50µM) e PGE2 (10-50µM). As capacidades destas moléculas de alterarem as propriedades adesivas de neutrófilos foram determinadas com um ensaio de adesão, *in vitro*, utilizando a fibronectina (FN, 20 µg/ml) como ligante. Estes fármacos foram utilizados em concentrações que sabidamente aumentam os níveis intracelulares de AMPc em neutrófilos (CONRAN *et al.*, 2007). A Figura 7 mostra que nenhum destes agentes foi capaz de aumentar as propriedades adesivas de neutrófilos controle e AF.



**Figura 6: Efeito de ativadores de sinalização dependente de AMPc nas propriedades adesivas de neutrófilos de indivíduos saudáveis. (A)** Forskolina, ativador de adenilil ciclase, n=13, **(B)** 8-br-AMPC, análogo de AMPc, n=20. Os neutrófilos foram incubados em placas de 96 poços, revestidas com FN, na presença de forskolina ou 8-br-AMPC (FN; 30 min, 37°C, 5% CO<sub>2</sub>). P>0.05 para todos os grupos; ANOVA (*repeated measures*)

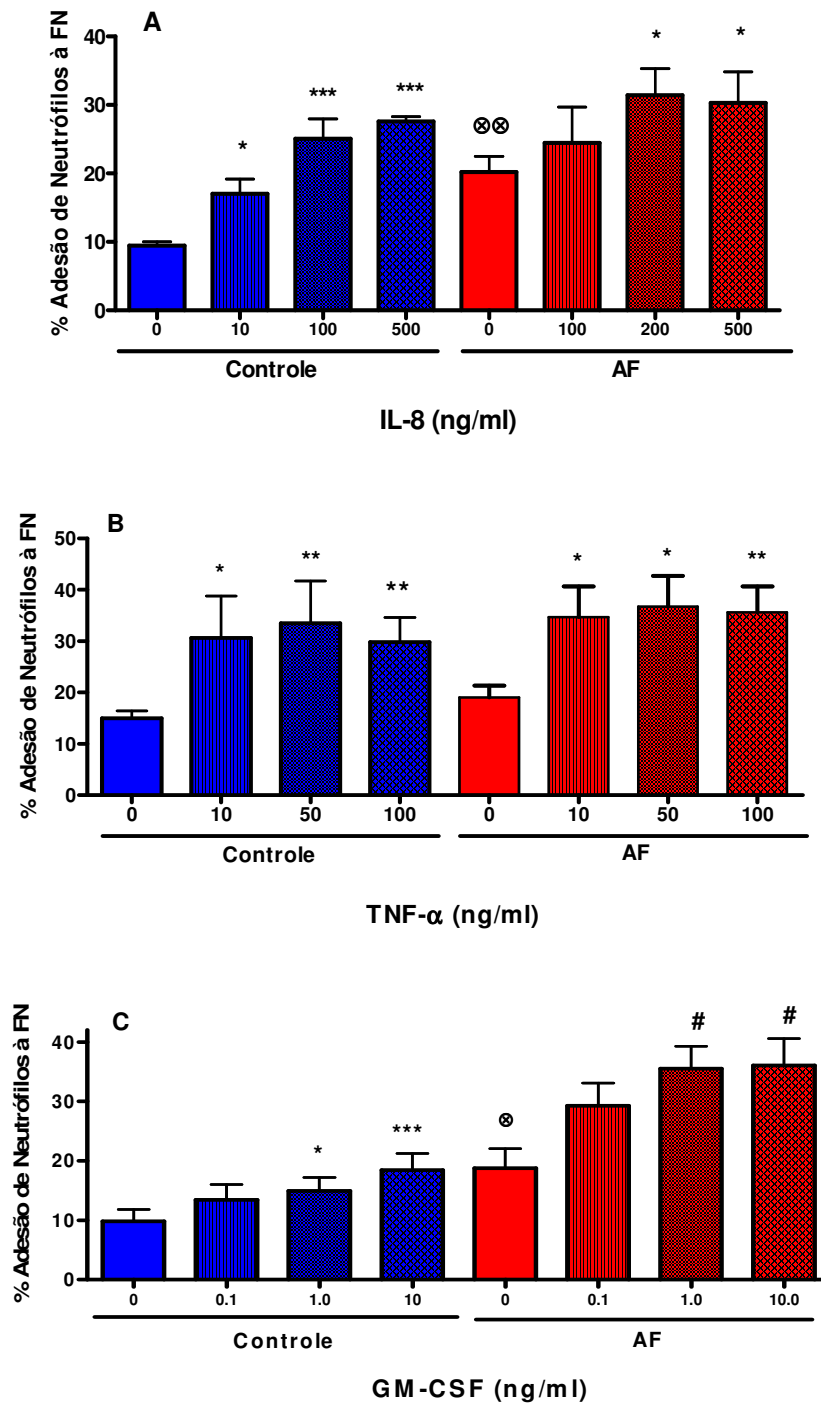




**Figura 7: Efeito de ativadores de sinalização dependente de AMPc nas propriedades adesivas de neutrófilos de indivíduos saudáveis e AF.** Os neutrófilos foram incubados em placas de 96 poços, revestidas com FN, na presença de: **(A)** Prostaglandina E1, n= 11 e **(B)** Prostaglandina E2, n=10 (FN; 30 min, 37°C, 5% CO<sub>2</sub>). P>0.05 para todos os grupos; ⊗, P<0.05, comparado com o controle. ANOVA (*repeated measures*).

#### **5.4 Efeito de moléculas inflamatórias nas propriedades adesivas de neutrófilos controle e AF**

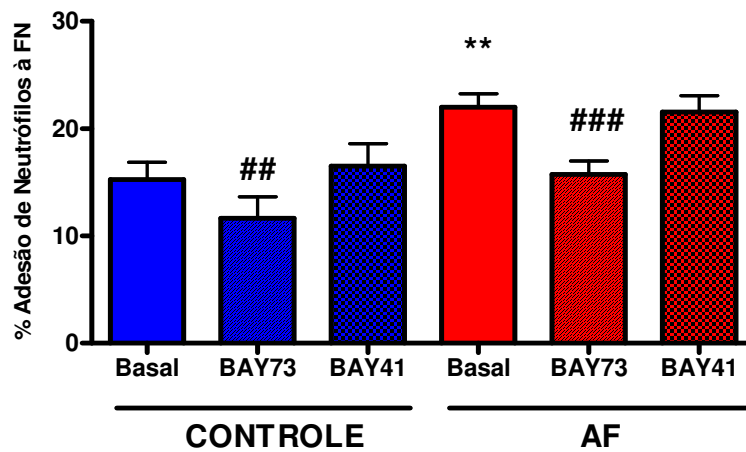
Os neutrófilos ( $2 \times 10^6$  células/mL) isolados de indivíduos controle e de pacientes com AF foram incubados com moléculas inflamatórias durante o ensaio de adesão para FN (20 µg/ml). As células foram incubadas com concentrações variadas de interleucina-8 (IL-8; 10-500 ng/ml) (Figura 8A), TNF- $\alpha$  (10-100 ng/mL) (Figura 8B) e GM-CSF (1-10 ng/ml) (Figura 8C). A Figura 8 mostra que todas essas moléculas foram capazes de aumentar significativamente as propriedades adesivas tanto dos neutrófilos controle quanto de pacientes com AF.



**Figura 8: Efeito de moléculas inflamatórias nas propriedades adesivas de neutrófilos de indivíduos saudáveis (controle) e de pacientes com anemia falciforme (AF). (A) IL-8,  $n \geq 4$ ; (B) TNF $\alpha$ ,  $n \geq 4$ ; (C) GM-CSF,  $n \geq 4$  (FN; 30 min, 37°C, 5% CO<sub>2</sub>). \*,  $P < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.01$ ; \*\*\*,  $P < 0.001$ , comparado com adesão basal (0 ng/ml); ⊗,  $P < 0.05$ ; ⊗⊗,  $p < 0.01$ , comparado com o controle; #,  $P < 0.05$ , comparado com o controle. ANOVA (repeated measures) e Bonferroni Multiple Comparisons Test.**

### **5.5 Efeito de agentes que elevam os níveis de GMPc intracelular sobre as propriedades adesivas dos neutrófilos de pacientes com AF e indivíduos controle**

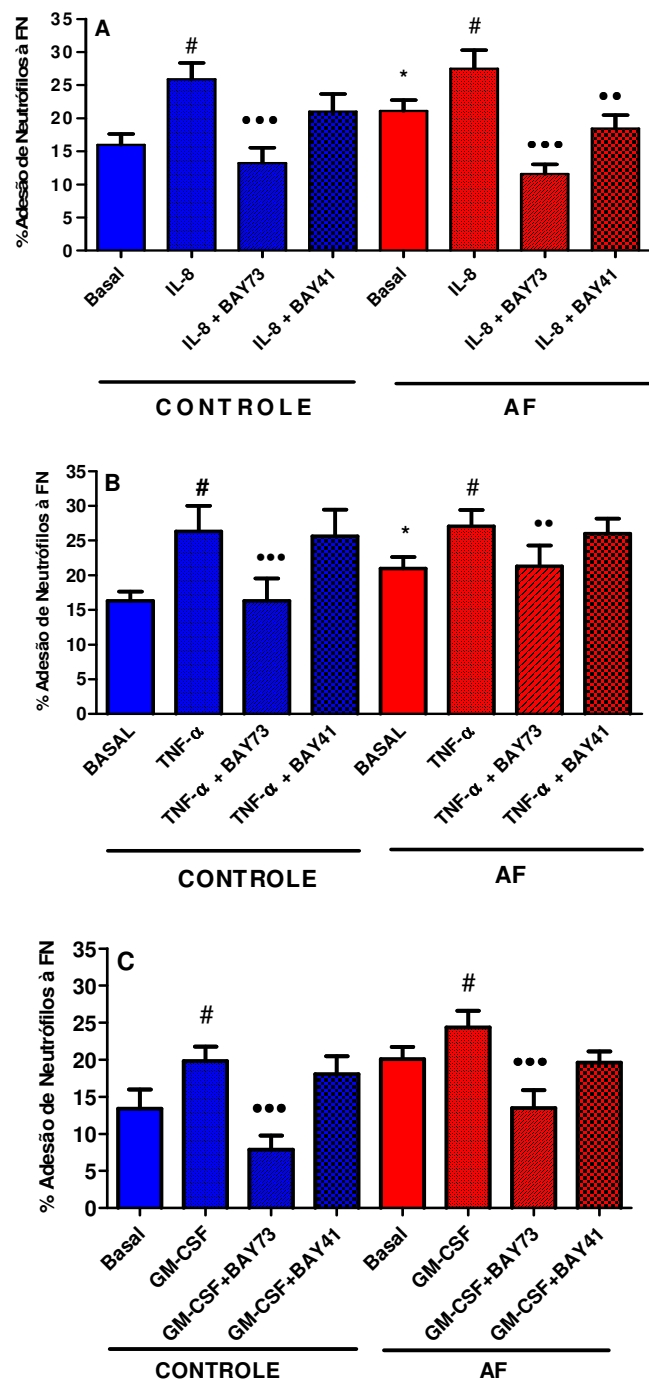
As propriedades adesivas de neutrófilos controle e neutrófilos com AF foram determinadas na presença do BAY 73-6691 (60  $\mu$ M), um inibidor específico de PDE9A, e BAY 41-2272 (60 nM), um estimulador de guanilato ciclase. Nas concentrações utilizadas, o BAY 73-6691, mas não o BAY 41-2272, reduziu significativamente as propriedades adesivas dos neutrófilos de ambos os grupos, controle e pacientes com AF (Figura 9). O veículo DMSO (quando utilizado sozinho) não teve efeito significativo sobre a adesão dos neutrófilos (dados não mostrados).



**Figura 9:** Efeito do Bay 73-6691 (60 $\mu$ M) e Bay 41-2272 (60nM) na adesão de neutrófilos de indivíduos saudáveis (controle) e pacientes com AF à fibronectina (30 min, 37°C, 5% CO<sub>2</sub>). \*\*,  $p < 0.01$ , comparado a adesão basal dos neutrófilos controle. ##,  $p < 0.01$ ; ###  $p < 0.001$ , comparado com a adesão basal. N=8, controles; N=10, AF; ANOVA (repeated measures) e Bonferroni Multiple Comparisons Test.

### **5.6 Efeito de agentes que elevam os níveis de GMPc intracelular sobre as propriedades adesivas dos neutrófilos AF e controle na presença de um estímulo inflamatório**

Os neutrófilos de indivíduos saudáveis (controle) e de pacientes com AF foram estimulados simultaneamente com os mediadores inflamatórios, IL-8 (200 ng/mL), TNF- $\alpha$  (50 ng/mL) e GM-CSF (10 ng/mL), em concentrações ideais para estimular adesão. Concomitantemente, as células foram incubadas com Bay 73-6691 (60  $\mu$ M) e Bay 41-2272 (60 nM) e a adesão a FN (20  $\mu$ g/mL) foi determinada. A Figura 10 demonstra que o inibidor de PDE9A, Bay 73-6691, foi capaz de inibir a adesão dos neutrófilos controle e AF após estímulo inflamatório. Em contraste, o Bay 41-2272, foi capaz de inibir significativamente apenas a adesão de neutrófilos AF após estímulo com IL-8. O veículo DMSO, quando utilizado sozinho não teve efeito sobre a adesão dos neutrófilos após os estímulos inflamatórios (dados não mostrados).



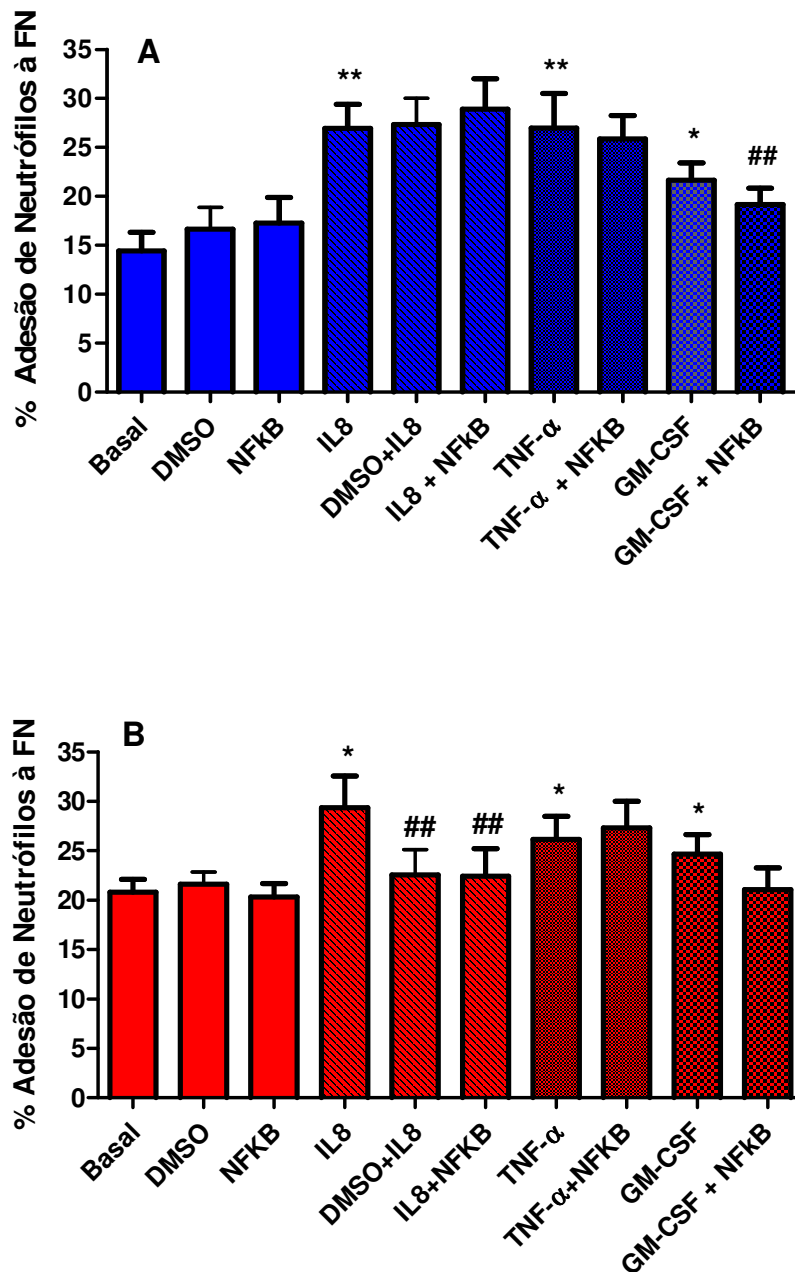
**Figura 10: Efeito do Bay 73-6691 (60  $\mu$ M) e Bay 41-2272 (60 nM) nas propriedades adesivas dos neutrófilos de pacientes com AF e indivíduos controle quando estimulados com moléculas inflamatórias (30 min, 37°C, 5% CO<sub>2</sub>). (A) IL-8 (200 ng/mL); Controles (n=8) e AF (n=6); (B) TNF- $\alpha$  (50 ng/mL); controles (n=12) e AF (n=10); (C) GM-CSF (10 ng/mL); controles (n=7) e AF (n=10); #,  $p < 0.05$ , comp. com adesão basal. \*,  $p < 0.05$ , comp. com adesão basal de neutrófilos controles; \*\*,  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ , comp. com a adesão com IL-8/TNF- $\alpha$ /GM-CSF. ANOVA (repeated measures) e Bonferroni Multiple Comparisons Test.**

### **5.7 Efeito do inibidor de ativação de NFκB nas propriedades adesivas dos neutrófilos AF e controle**

Há evidências de uma ativação do fator de transcrição, NFκB, em células endoteliais de indivíduos com AF (CONRAN & COSTA, 2009). Para investigar se este fator de transcrição desempenha algum papel nas propriedades adesivas de leucócitos, foi avaliado a adesão de neutrófilos controle e AF à FN na presença do inibidor de ativação de NFκB (NFκB Activation Inhibitor, Calbiochem) na concentração de (400 nM; 4 vezes o IC<sub>50</sub> da droga). A Figura 11A mostra que, inesperadamente, o inibidor de NFκB, promoveu um discreto aumento, mas não significativo, da adesão basal de neutrófilos controle e de neutrófilos estimulados com IL-8 à FN, mas diminui a adesão de neutrófilos controle após um estímulo com GM-CSF. O DMSO, quando utilizado na mesma concentração de veículo (400 nM), não teve um efeito significativo na adesão de neutrófilos controle.

Em contraste, quando neutrófilos de pacientes com AF foram incubados com o inibidor de NFκB, houve uma redução significativa na adesão de neutrófilos AF após o estímulo com o IL-8, porém em uma concentração similar a de DMSO (veículo) foi observada uma diminuição da adesão dos neutrófilos AF após estímulo com IL-8. No entanto, esta redução não foi significativa (Figura 11B). Por outro lado, o inibidor de NFκB na ausência ou presença do estímulo com TNF-α e GM-CSF não foi capaz de alterar as propriedades adesivas dos neutrófilos AF.

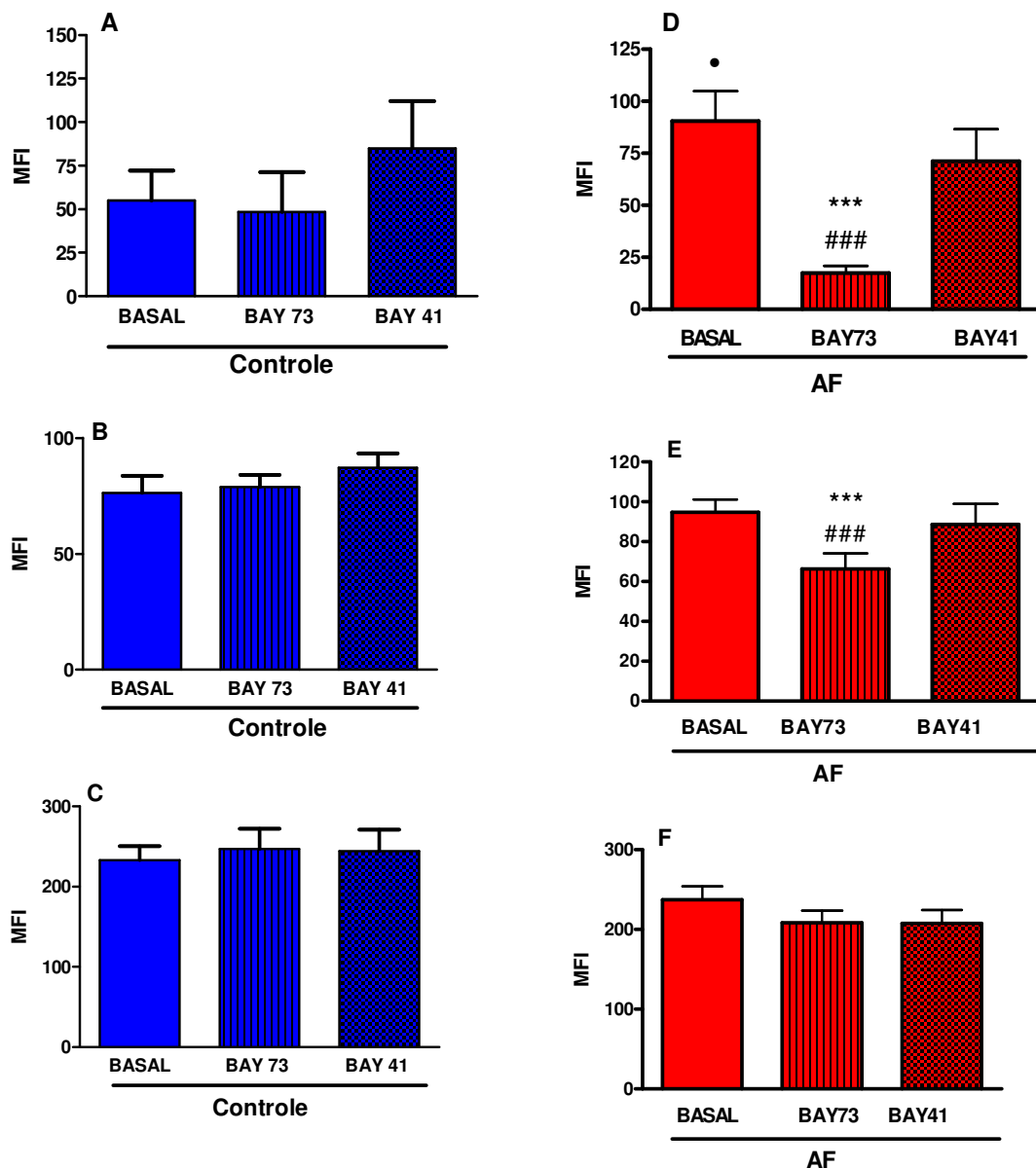




**Figura 11: Efeito do inibidor de ativação de NFκB (400nM) nas propriedades adesivas dos neutrófilos de pacientes com AF e indivíduos controle quando estimulados ou não com moléculas inflamatórias (30 min, 37°C, 5% CO<sub>2</sub>).** (A) Neutrófilos de indivíduos controles (n≥8); (B) Neutrófilos de indivíduos AF (n≥7); \*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$ , comp. com adesão basal. ##  $p < 0.01$  comp. com a adesão com IL-8, TNF-α ou GM-CSF. Paired T test, ANOVA (repeated measures) e Bonferroni Multiple Comparisons Test.

## **5.8 Efeito de agentes que elevam os níveis de GMPc intracelular na expressão de moléculas de adesão na superfície dos neutrófilos de pacientes com AF e indivíduos controle**

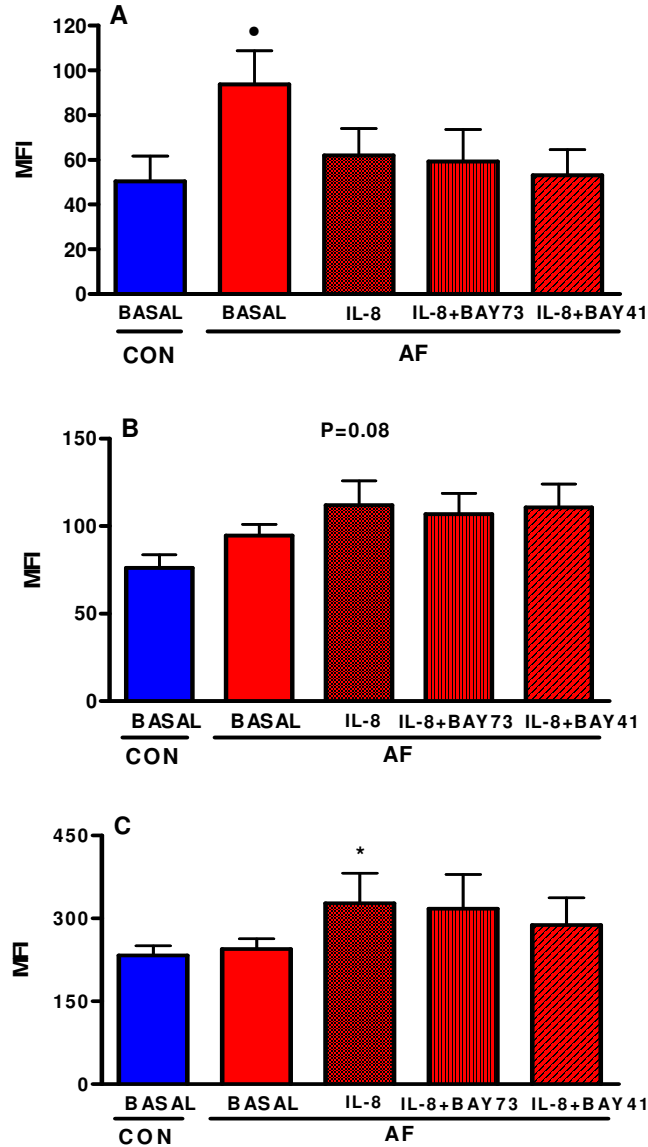
As expressões das moléculas de adesão, CD62L (L-selectina), CD11b (Mac-1 subunidade  $\alpha$ ) e CD11a (LFA-1 subunidade  $\alpha$ ), na superfície dos neutrófilos, foram determinadas em neutrófilos de indivíduos controle e pacientes com anemia falciforme. A expressão de CD62L na superfície de neutrófilos de pacientes com anemia falciforme foi significativamente maior quando comparada com a expressão dos neutrófilos controle (Figura 12 A,D) enquanto que a expressão de CD11b está discretamente, mas não significativamente maior, na superfície de neutrófilos AF (Figura 12 B,E). Em contrapartida, não houve alteração na expressão de CD11a na superfície de neutrófilos AF (Figura 12 C,F). A incubação de neutrófilos AF com BAY 73-6691 (60  $\mu$ M; 60 min, 37°C), mas não BAY 41-2272 (150 nM), diminuiu significativamente a expressão de CD62L e CD11b, mas não CD11a, na superfície de neutrófilos AF (Figura 12).



**Figura 12: Efeito do BAY 73-6691 (60  $\mu$ M) e BAY 41-2272 (150 nM) na expressão de (A) CD62L, (B) CD11b e (C) CD11a na superfície de neutrófilos de indivíduos controle (CON) e (D) CD62L, (E) CD11b e (F) CD11a na superfície de neutrófilos de pacientes com anemia falciforme (AF).** As células foram incubadas com os agentes por 60 min, 37°C, 5% CO<sub>2</sub> antes de determinar a expressão de proteínas através da citometria de fluxo. A intensidade de fluorescência por célula (MFI) foi determinada por um anticorpo anti-molécula de adesão em 10.000 eventos adquiridos, como descrito. •, P<0.05, comparando basal AF/Controle; \*\*\*, P<0.001, comparando as células tratadas com BAY 73-6691 com adesão basal; ###, P<0.001, comparando as células tratadas com BAY 73-6691 com as células tratadas com BAY 41-2272. Resultados foram apresentados como médias  $\pm$  SEM; N $\geq$  7 para A, B e C e N $\geq$  7 para D, E e F. ANOVA (*repeated measures*) e Bonferroni Multiple Comparisons Test.

### **5.9 Efeito de agentes que elevam os níveis de GMPc intracelular na expressão de moléculas de adesão na superfície de neutrófilos AF após estimulação com IL-8**

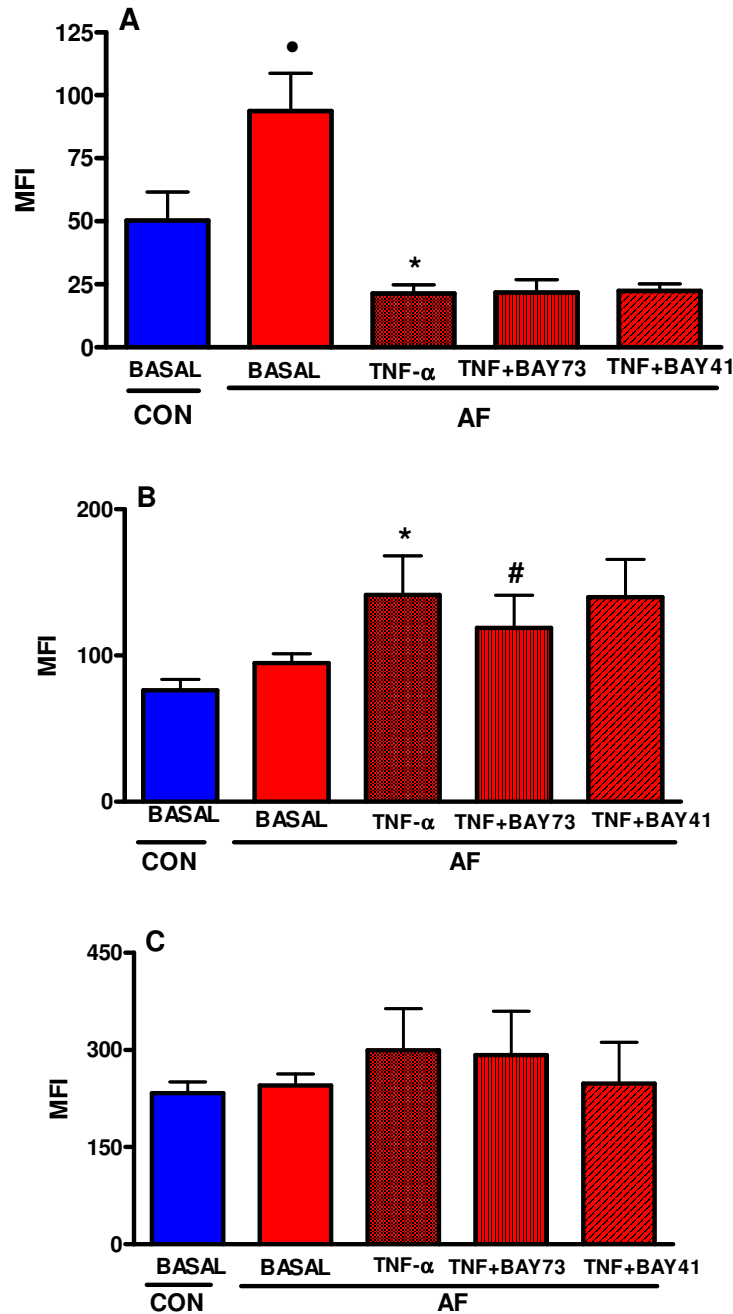
Após estímulo com IL-8 (200 ng/ml, 60 min), as expressões de CD62L e CD11b não foram significativamente alteradas na superfície de neutrófilos AF (Figura 13 A e B); em contraste, a IL-8 diminuiu significativamente a expressão de CD11a na superfície de neutrófilos AF (Figura 13C). No entanto, a co-incubação de neutrófilos AF com ambos IL-8 e BAY 73-6691 (60  $\mu$ M) ou BAY 41-2272 (150 nM) não alterou significativamente a expressão dessas moléculas na superfície de neutrófilos AF, quando comparada com as células estimuladas apenas com IL-8 (Figura 13).



**Figura 13: Efeito do BAY 73-6691 (60  $\mu$ M) e BAY 41-2272 (150 nM) na expressão de (A) CD62L, (B) CD11b e (C) CD11a na superfície de neutrófilos de indivíduos controle (CON) e pacientes com anemia falciforme (AF) estimulados com IL-8 (200 ng/ml).** As células foram incubadas com os agentes por 60 min, 37°C, 5%CO<sub>2</sub> na presença ou ausência dos agentes e IL-8, antes de determinar a expressão protéica através de citometria de fluxo. A intensidade de fluorescência por célula (MFI) foi determinada por um anticorpo anti-molécula de adesão em 10.000 eventos adquiridos, como descrito. •,  $P < 0.05$ , comparando basal AF/Controle; \*,  $P < 0.05$ , comparando estímulo por IL-8 com células sem estímulo.  $P = 0.08$ , comparando estímulo IL-8 com células sem estímulo. Resultados foram apresentados como médias  $\pm$  SEM;  $N \geq 5$  para A, B e C. ANOVA (*repeated measures*) e Bonferroni Multiple Comparisons Test.

#### **5.10 Efeito de agentes que elevam os níveis de GMPc intracelular na expressão de moléculas de adesão na superfície de neutrófilos AF após estimulação com TNF- $\alpha$**

Após o estímulo com TNF- $\alpha$  (50 ng/ml, 60 min), a expressão de CD62L diminuiu significativamente na superfície de neutrófilos AF (Figura 14A); em contraste, o TNF- $\alpha$  aumentou significativamente a expressão de CD11b na superfície de neutrófilos AF (Figura 14B), porém não alterou a expressão de CD11a na superfície de neutrófilos AF (Figura 14C). No entanto, a co-incubação de neutrófilos AF com ambos TNF- $\alpha$  e BAY 73-6691 (60  $\mu$ M) ou BAY 41-2272 (150 nM) não foi capaz de alterar significativamente a expressão de CD62L e CD11a na superfície de neutrófilos AF quando comparada com as células estimuladas apenas com TNF- $\alpha$  (Figura 14 A e C); entretanto a expressão de CD11b diminuiu significativamente na superfície de neutrófilos AF (Figura 14B).

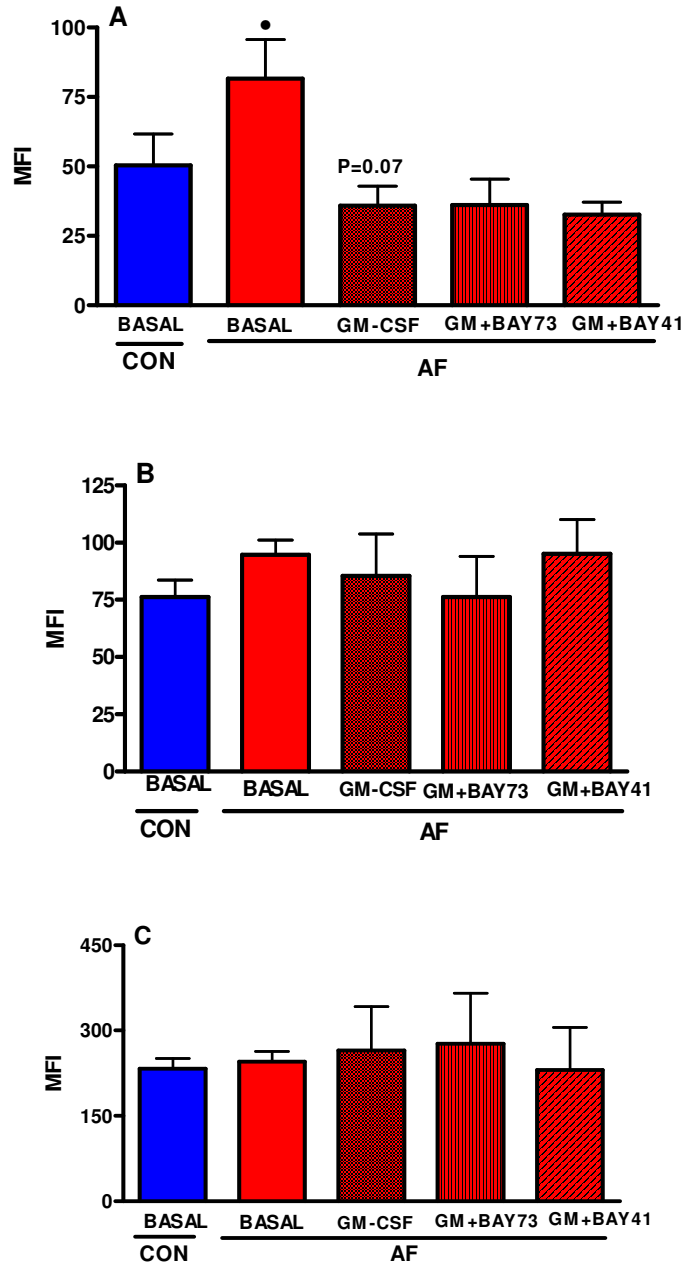


**Figura 14: Efeito do BAY 73-6691 (60  $\mu$ M) e BAY 41-2272 (150 nM) na expressão de (A) CD62L, (B) CD11b e (C) CD11a na superfície de neutrófilos de indivíduos controle (CON) e pacientes com anemia falciforme (AF) estimulados com TNF- $\alpha$  (50 ng/ml).** As células foram incubadas com os agentes por 60 min, 37°C, 5%CO<sub>2</sub> na presença ou ausência dos agentes e TNF- $\alpha$ , antes de determinar a expressão das moléculas de adesão na superfície dos neutrófilos através de citometria de fluxo. A intensidade de fluorescência por célula (MFI) foi determinada por um anticorpo anti-molécula de adesão em 10.000 eventos adquiridos, como descrito. \*, P<0.05, comparando estímulo de TNF- $\alpha$  com células sem estímulo. #, P<0.05, comparando BAY 73-6691 com TNF- $\alpha$ . Resultados foram apresentados como médias  $\pm$  SEM; N $\geq$  5 para A, B e C. ANOVA (*repeated measures*) e Bonferroni Multiple Comparisons Test.

### **5.11 Efeito de agentes que elevam os níveis de GMPc intracelular na expressão de moléculas de adesão na superfície de neutrófilos AF após estimulação com GM-CSF**

Após o estímulo com GM-CSF (10 ng/mL, 60 min), a expressão de CD62L na superfície de neutrófilos AF diminuiu, no entanto, esta redução não foi significativa (Figura 15A); as expressões de CD11a e CD11b não foram alteradas na superfície de neutrófilos AF após incubação com GM-CSF (Figura 15 B e C). A co-incubação de neutrófilos AF com ambos GM-CSF e BAY 73-6691 (60  $\mu$ M) ou BAY 41-2272 (150 nM) não foi capaz de alterar significativamente a expressão dessas moléculas na superfície de neutrófilos AF, quando comparada com as células estimuladas apenas com GM-CSF (Figura 15).





**Figura 15: Efeito do BAY 73-6691 (60  $\mu$ M) e BAY 41-2272 (150 nM) na expressão de (A) CD62L, (B) CD11b e (C) CD11a na superfície de neutrófilos de indivíduos controle (CON) e pacientes com anemia falciforme (AF) quando estimulados com GM-CSF (10 ng/ml). As células foram incubadas com os agentes por 60 min, 37°C, 5%CO<sub>2</sub> na presença ou ausência dos agentes e GM-CSF, antes de determinar a expressão protéica através de citometria de fluxo. A intensidade de fluorescência por célula (MFI) foi determinada por um anticorpo anti-molécula em 10.000 eventos adquiridos, como descrito. •,  $P < 0.05$ , comparando adesão basal CON/AF;  $p = 0.07$ , quando comparando expressão na presença e ausência de GM-CSF. Resultados foram apresentados como médias  $\pm$  SEM;  $N \geq 5$  para A, B e C. ANOVA (repeated measures) e Bonferroni Multiple Comparisons Test.**

### **5.12 Efeito das moléculas inflamatórias e de agentes que elevam os níveis de GMPc intracelular nas propriedades adesivas de células vermelhas controle e AF**

As células vermelhas ( $2 \times 10^6$  células/mL) de pacientes com AF apresentaram uma capacidade significativamente maior de aderirem à fibronectina (FN; 20 $\mu$ g/ml) em relação às células vermelhas de indivíduos controle, como representado na Tabela 3.

As células vermelhas isoladas de indivíduos controle e de pacientes com AF foram incubadas com concentrações variadas de IL-8 (10-500 ng/ml) e TNF- $\alpha$  (10-100 ng/mL) e a adesão à FN foi determinada. Não houve diferença significativa das propriedades adesivas das hemácias de indivíduos controle e AF na presença de estímulo inflamatório.

Simultaneamente, as hemácias foram estimuladas com IL-8 (200 ng/mL) e TNF- $\alpha$  (50 ng/mL) na presença do Bay 73-6691 (60  $\mu$ M) e Bay 41-2272 (60 nM). A Tabela 3 mostra que essas moléculas não foram capazes de alterar significativamente as propriedades adesivas tanto das células vermelhas controle quanto de pacientes com AF. O veículo DMSO, quando utilizado sozinho, não teve efeito sobre a adesão das células vermelhas após os estímulos inflamatórios (dados não mostrados).

**Tabela 3 Efeito da estimulação de citocinas e co-incubação com agentes que elevam os níveis de GMPc intracelular nas propriedades adesivas de células vermelhas controle e AF.**

% Adesão de células vermelhas à FN (média±SEM)						
	Controles			AF		
	Basal N=6	IL-8 (200ng/ml) N=6	TNF- $\alpha$ (100ng/ml) N=6	Basal N=6	IL-8 (200ng/ml) N=6	TNF- $\alpha$ (100ng/ml) N=6
<b>Basal</b>	8.5±1.6	7.8±1.7	6.5±1.0	12.9±1.7*	12.32±1.9	11.4±1.9
<b>BAY 73-6691 (60µM)</b>	n/d	n/d	n/d	14.8±1.0	n/d	n/d
<b>BAY 41-2272 (60 nM)</b>	n/d	n/d	n/d	16.4±1.3	n/d	n/d

\*, diferença significativa P<0.05; n/d: não determinado

## DISCUSSÃO

---

## 6 DISCUSSÃO

Achados na literatura sugerem que a adesão de leucócitos ao endotélio vascular na microcirculação é de extrema importância para o processo vaso-oclusivo, pelo menos em animais transgênicos falciformes (TURHAN *et al.*, 2002). Em pacientes com AF, há evidências de que o neutrófilo também exerça um papel importante na fisiopatologia da doença. O número de leucócitos encontra-se aumentado em pacientes com AF e essa leucocitose é associada com um aumento na morbidade e mortalidade nestes pacientes (PLATT *et al.*, 1994). Além disso, estudos *in vitro* indicam que neutrófilos de pacientes com AF (em estado estável) possuem propriedades adesivas aumentadas. Em associação, esta doença é caracterizada por uma inflamação crônica, mas até o momento, o papel desta inflamação na ativação de leucócitos não está totalmente esclarecido.

Várias evidências sugerem que a sinalização dependente de AMPc exerce papel pró e antiinflamatório nos leucócitos (LORENOWICZ *et al.*, 2007). Há dados que indicam que a elevação dos níveis de AMPc parece regular negativamente a adesão dos leucócitos por indução da L-selectina e por inibição da expressão e ativação da integrina  $\beta_2$  durante a indução da adesão (DERIAN *et al.*, 1995; BERENDS *et al.*, 1997). Entretanto, outros estudos mostraram que a atividade da PKA pode ser necessária para sustentar a adesão mediada pelo agrupamento da integrina (JONES, 2002; LORENOWICA *et al.*, 2007). Estudos em nosso laboratório indicam que as prostaglandinas E1 e E2 encontram-se aumentadas na circulação de nossa população de pacientes com AF (CONRAN *et al.*, 2007; LANARO *et al.*, 2009) e que estas moléculas apresentam a capacidade de aumentar níveis intracelulares de AMPc em neutrófilos controle e AF (CONRAN *et al.*, 2007). Um dos objetivos deste estudo foi a busca de evidências que comprovassem que a via AMPc-PKA pudesse ter um papel na adesão alterada de neutrófilos e que essa via poderia representar um alvo terapêutico para diminuir a adesão de leucócitos à parede vascular. No entanto, a forskolina (ativador de adenilato ciclase) e 8-br-AMPc (análogo de AMPc) não foram capazes de alterar as propriedades adesivas dos neutrófilos de indivíduos saudáveis (controle) em nossos estudos *in vitro*. Adicionalmente, as prostaglandinas 1 e 2, importantes mediadores inflamatórios e ativadores da via de sinalização de AMPc, não foram capazes de alterar as propriedades adesivas dos neutrófilos controle, nem mesmo dos

neutrófilos AF. Assim, sugerimos que ainda são necessários estudos para comprovar um papel da via AMPc-PKA nos mecanismos de adesão de neutrófilos AF.

O processo vaso-oclusivo é primariamente iniciado pela adesão de ambas as células, vermelhas e brancas, à parede vascular (CHIANG & FRENETTE, 2005); no entanto, o papel que a inflamação desempenha nessas interações adesivas é mal compreendido. A anemia falciforme é agora reconhecida como uma doença inflamatória crônica e as cito/quimiocinas IL-8, TNF- $\alpha$  e GM-CSF são apenas algumas das moléculas inflamatórias conhecidas por estarem aumentadas na circulação de pacientes com AF (CROIZAT, 1994; CONRAN *et al.*, 2007; LANARO *et al.*, 2009). Cada uma dessas moléculas inflamatórias foi utilizada para induzir a adesão de neutrófilos controle e pacientes com AF à fibronectina imobilizada, ligante intracelular. Em um estudo anterior, verificamos que, adicionalmente à IL-8, IL-6 e o fator estimulador de colônia de granulócitos (G-CSF), também podem aumentar a adesão de neutrófilos AF à fibronectina (ASSIS *et al.*, 2005); assim, os dados indicam que inúmeras moléculas inflamatórias são capazes de induzir a adesão de neutrófilos AF.

Em nossa população de pacientes, os níveis plasmáticos de aproximadamente 5-60 pg/ml de IL-8, 1-7.5 pg/ml de TNF- $\alpha$  e 0.05-1.8 pg/ml de GM-CSF foram observados, utilizando-se ELISA (LANARO *et al.*, 2009; CONRAN *et al.*, 2007) e parece razoável supor que os níveis das moléculas inflamatórias são provavelmente mais concentrados em vasos de sítios inflamatórios. Como tal, as concentrações de citocinas utilizadas no presente estudo provavelmente são fisiologicamente relevantes. Os neutrófilos são as primeiras células a serem recrutadas para os sítios de inflamação, onde IL-8 (CXCL8) é uma das moléculas mais importantes envolvidas no recrutamento de tais células (KOBAYASHI, 2008). A estimulação por TNF- $\alpha$  foi demonstrada para iniciar a adesão de leucócitos à parede do vaso, bem como aumentar as interações dos glóbulos vermelhos e leucócitos, nas vênulas cremastéricas de camundongos falciformes (TURHAN *et al.*, 2002; TURHAN *et al.*, 2004). Além da função conhecida de GM-CSF como um regulador de linhagens de granulócitos e macrófagos, esta citocina é agora reconhecida em participar dos mecanismos inflamatórios (HAMILTON, 2008). GM-CSF é expresso em níveis mais elevados nos locais de inflamação e parece ativar as células, como neutrófilos, levando o aumento destes a produção de outras moléculas inflamatórias, como IL-8, e aumento da sobrevivência e funções como a adesão (HAMILTON, 2008). Assim, dados demonstraram que a IL-8, GM-CSF e TNF- $\alpha$  aumentaram a adesão dos neutrófilos e esse aumento foi maior nas

propriedades adesivas dos neutrófilos AF apoiando a teoria de que estas moléculas inflamatórias, entre outras, podem contribuir para as interações entre leucócitos e parede adesiva do vaso e, portanto, no processo de vaso-oclusão.

Os dados da literatura sugerem que o NO (importante vasodilatador fisiológico) possa ter um papel importante na fisiopatologia da anemia falciforme durante o estresse oxidativo (MACK & KATO, 2006). A elevação de GMPc por ativação da enzima guanilato ciclase (principal enzima alvo de NO), nas células de músculo liso, é responsável pela vasodilatação e por outras funções fisiológicas regulatórias de NO (IGNARRO, 2002). A ativação da guanilato ciclase leva ao aumento intracelular de GMPc, o qual torna ativada a quinase dependente de GMPc que media a ação de NO, incluindo o vaso-relaxamento, aumento da permeabilidade vascular, bem como os efeitos antiproliferativos, anti-plaquetários e antioxidantes do NO (LUGNIER *et al*, 1999). Há evidências que a biodisponibilidade do NO esteja diminuída em pacientes com anemia falciforme (MACK & KATO, 2006), principalmente devido ao seqüestro do NO pela hemoglobina livre no plasma liberado durante a hemólise. O NO e, por sua vez, o GMPc, são sabidamente capazes de diminuir as propriedades adesivas de neutrófilos e de outras células como as células endoteliais, por diminuir a expressão e função das moléculas de adesão na superfície destas células (CONRAN & COSTA 2009).

Para compreender alguns dos mecanismos de sinalização molecular que podem ser direcionados para reduzir a aderência de leucócitos aos vasos de pacientes com AF, nós co-incubamos os neutrófilos com dois agentes que elevam GMPc intracelular, o BAY 73-6691, que inibe PDE9A e o BAY 41-2272, um agente estimulador de guanilato ciclase. Estudos anteriores indicam que a estimulação dependente da sinalização do NO / GMPc pode reduzir a expressão e / ou função de integrinas na superfície dos leucócitos (CONRAN *et al.*, 2001; CANALLI *et al.*, 2008). Na concentração empregada, o BAY 73-6691 diminuiu significativamente tanto a aderência de neutrófilos controle quanto de pacientes com AF à fibronectina, e este efeito foi acompanhado por uma diminuição da expressão de L-selectina (CD62L, molécula de adesão), importante para a função de rolamento de leucócitos, e também por uma diminuição na expressão de Mac-1 (CD11b) na superfície de células não-estimuladas. O BAY 73-6691 também reduziu significativamente a adesão de neutrófilos AF após estimulação com IL-8, TNF- $\alpha$  e GM-CSF à FN; no entanto, alterações significativas na expressão de moléculas de adesão não foram observadas nos neutrófilos AF após

estimulação com IL-8 que foram co-incubadas com BAY 73-6691. Os dados sugerem que sem estimulação dos neutrófilos AF, o BAY 73-6691 pode reduzir a adesão celular, pelo menos em parte, pela diminuição da apresentação de moléculas de adesão, como Mac-1, na superfície da célula; e se isso ocorre por uma indução de derramamento de proteínas, ou por outro mecanismo, ainda precisa ser esclarecido. Em contraste, BAY 73-6691 não conseguiu reduzir a expressão da molécula de adesão na superfície de neutrófilos AF estimulados por IL-8, mas reduziu significativamente a adesão celular. A participação das integrinas, como Mac-1, na adesão de neutrófilos, não depende apenas da expressão dessa proteína, mas também na conformação de afinidade destas moléculas (LUO *et al.*, 2007). Portanto, as citocinas, como IL-8, podem aumentar a adesão de neutrófilos AF, aumentando a função das moléculas de adesão (ou seja, afinidade), bem como pelo aumento da expressão da molécula de adesão. Por sua vez, BAY 73-6691 pode reduzir a adesão de neutrófilos citocina-estimulada, diminuindo a afinidade do ligante das moléculas de adesão, em vez de diminuir a expressão da proteína ou expressão. Outro aspecto interessante é o fato de que a enzima PDE9A tem uma distribuição relativamente limitada nos tecidos, sendo encontrado até agora em células hematopoéticas e tecido cerebral (ALMEIDA *et al.*, 2008). A inibição de uma enzima que possui uma distribuição limitada pode ser interessante por levar a menores efeitos colaterais. Este inibidor de PDE9A está em fase de ensaios pré-clínicos para o tratamento da doença de Alzheimer sendo sugerido como uma terapia para melhorar a consolidação da memória através da estimulação da via NO/GMPc (WUNDER *et al.*, 2005).

Neste trabalho, foi utilizado o estimulador de GC, o BAY 41-2272, que produz um potente relaxamento de artérias e veias coronárias e sistêmicas e é capaz de reduzir a pressão de reperfusão coronária em coração de ratos (EVGENOV *et al.*, 2006). Além disso, estudos mostram que esta droga é capaz de inibir a expressão de P-selectina em plaquetas e nas células endoteliais *in vitro* e reduzir o rolamento e a adesão dos leucócitos *in vivo*, indicando um prévio papel dessa droga na modulação da resposta inflamatória (AHLUWALIA *et al.*, 2004). Incubação das células com o estimulador da guanilato ciclase, BAY 41-2272, não teve um efeito significativo sobre as propriedades adesivas de neutrófilos controle e AF não-estimulados, nos estudos atuais. Quando os neutrófilos AF foram estimulados com IL-8 e co-incubados com BAY 41-2272, foi observada uma redução na inibição, embora esta diminuição não foi tão significativa quanto a observada quando as mesmas células foram co-incubadas com BAY 73-6691.



O BAY 41-2272 foi utilizado no estudo presente em concentrações de 60 e 150 nM. A concentração efetiva desse agente é relatada a variar entre os níveis nanomolares para níveis micromolares; porém, IC<sub>50</sub> de BAY 41-2272 para a inibição da agregação plaquetária é de 36 nM (STASCH *et al.*, 2001), e as concentrações milimolares deste composto têm sido sugeridas para inibir as enzimas, como PDE5, em adição da enzima guanilato ciclase (BISCHOFF *et al.*, 2004; MULLERSHAUSEN *et al.*, 2004); como tal, acreditamos que a concentração deste agente utilizado foi adequado para os objetivos do estudo em questão.

Na análise por citometria de fluxo, que identifica a expressão superficial de moléculas, foi observado um aumento significativo da expressão de L-selectina (CD62L), importante molécula de adesão para a função de rolamento dos neutrófilos, na superfície de neutrófilos AF quando comparado ao controle.. Na presença do estímulo com BAY 73-6691, mas não BAY 41-2272, houve uma diminuição na expressão de L-selectina e na redução da integrina Mac-1 na superfície dessas células. Após estímulo inflamatório com IL-8 foi observada uma diminuição da expressão da integrina LFA-1 (CD11a), importante por promover o rolamento da célula, na superfície de neutrófilos AF quando comparados ao controle. Na presença do estímulo com TNF- $\alpha$ , foi verificada uma redução da expressão de CD62L e aumento de CD11b na superfície de neutrófilos AF. Com o estímulo de TNF- $\alpha$  concomitante com BAY 73-6691, curiosamente foi observada uma redução significativa da expressão na superfície dessas células. As integrinas são conhecidas por mediar alterações nas propriedades adesivas das células hematopoéticas. Essas alterações são causadas pela mobilização dessas moléculas de adesão na superfície celular (SIMS, 2002), pela mudança na afinidade (SHIMAOKA *et al.*, 2002) e avidéz da integrina. Desse modo, é possível que o aumento das propriedades adesivas, observado nos neutrófilos de pacientes com AF possa ser mediado pela alteração na afinidade das integrinas, e não por alterações na expressão dessas moléculas na superfície celular.

Além de drogas que atuam na via de sinalização dos nucleotídeos cíclicos, AMPc e GMPc, foi estudado o efeito do inibidor da ativação do fator de transcrição, NFkB. Há relatos de que o NFkB é ativado em células endoteliais na AF e por este motivo decidimos investigar o seu papel na adesão de neutrófilos de indivíduos controle e AF sob estímulo inflamatório. O inibidor utilizado foi capaz de aumentar discretamente a adesão de neutrófilos controle. Nos neutrófilos AF, foi observada uma inibição de adesão somente após o estímulo com IL-8, no entanto, a mesma

concentração de DMSO veículo também diminuiu (mas não significativamente) a adesão de neutrófilos após estímulo com o IL-8. Na ausência ou presença do estímulo com TNF- $\alpha$  e GM-CSF e o inibidor de NF $\kappa$ B não houve alterações significativas das propriedades adesivas de neutrófilos AF. Portanto, não foram observadas evidências de que a ativação do fator de transcrição, NF $\kappa$ B, apresente um papel significativo nas propriedades adesivas de neutrófilos AF, sem e com estímulo inflamatório.

As células vermelhas de pacientes com AF, ao contrário das células vermelhas normais, são capazes de aderir aos componentes da parede vascular. Dessa forma, acredita-se que é essa adesão anormal que contribui para as crises vaso-oclusivas que ocorrem em pacientes com AF (HINES, 2003). Nossos resultados com ensaios de adesão estáticos demonstraram que, em níveis basais, as células vermelhas falciformes aderiram significativamente mais à FN do que as células vermelhas normais. No entanto, as células vermelhas de pacientes com AF não apresentaram alterações das propriedades adesivas tanto após estimulação com mediadores inflamatórios quanto na presença simultânea de mediadores inflamatórios e agentes que elevam os níveis de GMPc intracelular. Diante disso, outros fatores, além do estímulo inflamatório, podem contribuir para a indução da adesão das células vermelhas de pacientes com AF ao endotélio vascular.

Assim, os resultados dão suporte à idéia de que as moléculas inflamatórias geradas nos locais de inflamação podem desempenhar um papel na indução da adesão de leucócitos à parede do vaso na anemia falciforme. A elevação dos níveis de GMPc intracelular em leucócitos pode ser uma abordagem interessante para inibir a adesão destas células à parede do vaso e, portanto, reduzir os mecanismos vaso-oclusivos, mesmo na presença de um estímulo inflamatório. Embora drogas que elevam GMPc, tais como o sildenafil, têm sido preconizada para o tratamento de algumas manifestações de anemia falciforme, incluindo a hipertensão pulmonar (MACHADO *et al.*, 2005), dados recentes sugerem que a sinalização dependente de GMPc pode mediar os mecanismos da dor neuropática (HUANG *et al.*, 2010). Agentes que elevam GMPc em tipos de células específicas podem, assim, manter a promessa para uso em terapia da AF. O BAY 73-6691 inibe especificamente PDE9A, uma enzima que parece ser altamente expressa em células hematopoéticas e estudos futuros poderão determinar se este agente pode ser uma alternativa útil para a diminuição da adesão de leucócitos em AF.

## CONCLUSÃO

---

## 7 CONCLUSÃO

- Nossos resultados sugerem que os neutrófilos AF possuem uma maior capacidade de aderirem à FN, quando comparados aos neutrófilos controle;
- Ativadores diretos da via de sinalização dependente em AMPc não alteram as propriedades adesivas de neutrófilos;
- Vários mediadores inflamatórios (IL-8, GM-CSF e TNF  $\alpha$ ), que são encontrados em níveis elevados no plasma de pacientes AF, foram capazes de aumentar as propriedades adesivas tanto de neutrófilos controle quanto de pacientes AF;
- A L-selectina está mais expressa nos neutrófilos AF mas não há dados que indicam a sua participação na adesão dos neutrófilos após estímulo inflamatório;
- As integrinas Mac-1 e LFA-1 possivelmente podem participar da adesão de neutrófilos AF na presença de estímulo inflamatório, porém é provável que essa adesão seja intermediada por aumentos na afinidade e não na expressão dessas moléculas;
- Agentes que aumentam os níveis de GMPc intracelular podem ser úteis para reduzir as propriedades adesivas de neutrófilos AF, mesmo na presença de um estado inflamatório;
- A inibição da enzima PDE9A, com conseqüente elevação de GMPc, pode representar um alvo terapêutico para drogas tecido/célula específicas necessitando de mais estudos *in vivo* e *in vitro* para a terapêutica da AF.

## **BIBLIOGRAFIA**

---

## 8 BIBLIOGRAFIA

- AHLUWALIA, A.; FOSTER, P.; SCOTLAND, R.S.; MCLEAN, P.G.; MATHUR, A.; PERRETTI, S.M. *et al.* Antiinflammatory activity of soluble guanylate cyclase: cGMP-dependent down-regulation of P-selectin expression and leukocyte recruitment. **PNAS**, 105: 1386-1391, 2004.
- ALMEIDA, C. B.; SAAD, S. T.O.; COSTA, F. F.; CONRAN, N. Increase expression of the cGMP-specific phosphodiesterase, PDE9A, in SCD reticulocytes and neutrophils and induction of erythroid gamma globin expression and reduction of SCD neutrophil adhesion following PDE9-inhibition. **American Society of Hematology, Blood**, 110: 995-996, 2008.
- ARRUDA, M. A.; ROSSI, A. G.; FREITAS, M. S.; BA-FIDALGO, C.; GRAÇA-SOUZA, A. V. Heme Inhibits Human Neutrophil Apoptosis: Involvement of Phosphoinositide 3-Kinase, MAPK, and NFκB; **J. Immunol**;173;2023-2030, 2004.
- ASSIS A.; CONRAN, N.; CANALLI, A.A.; LORAND-METZE, I.; SAAD, S.T.O.; COSTA, F.F. Effect of cytokines and chemokines on sickle neutrophil adhesion to fibronectin. **Acta Haematol** 113 (2): 130-6, 2005.
- ASSIS, A.; CONRAN, N.; CANALLI, A.A.; LORAND-METZE, I.; SAAD, S.T.O.; COSTA,F.F. Effect o cytokines on sickle neutrophil adhesion to fibronectin. **Acta Haematol**. 481, 2004.
- BARKETT, M.; GILMORE, T. D. Control of apoptosis by Rel/ NFκB transcription factors. **Oncogene** 18:6910–6924, 1999.
- BERENDS, C.; DIJKHUIZEN, B.; DE MONCHY, J.G; DUBOIS, A.E.; GERRITSEN,J; KAUFFMAN, H.F. Inhibition of PAF-induced expression of CD11b and shedding of L-selectin on human neutrophils and eosinophils by the type IV selective PDE inhibitor, rolipram. **Eur Respir J**, 10 (5): 1000-7, 1997.
- BISCHOFF, E.; STACH, J. Effects of the sGC Stimulator BAY 41-2272 Are Not Mediated by Phosphodiesterase 5 Inhibition , **Circulation AHA**, 2004 .
- BROWNE, P.V.; HEBBEL, R.P. CD36 positive stress reticulocytosis in sickle cell anemia. **J. Lab. Clin. Méd.** 127(4): 340-347, 1996.

- BRUNO, O.; BRULLO, C.; ARDUINO, N.; SCENONE, S.; RANISE, A.; BONDAVALLI, F.; OTTONELLO, L.; DAPINO, P.; DALLEGRI, F. Synthesis and biological evaluation of neutrophilic inflammation inhibitors. **IL FARMACO**. 59: 223-235, 2004.
- BUTCHER E.C. Leukocyte-endothelial cell recognition: three (or more) steps to specificity and diversity. **Cell**, 67(6):1033-6, 1991.
- CANALLI, A.A.; FRANCO-PENTEADO, C.F.; SAAD, S.T.O.; CONRAN, N.; COSTA, F.F. Increased Adhesive Properties of Neutrophils in Sick Cell Disease May Be Reversed by Pharmacological Nitric Oxide Donation. **Hematologia**, 93: 605-9, 2008.
- CANALLI, A.A.; FRANCO-PENTEADO, C.F.; TRAINA, F.; SAAD, S.T.O.; COSTA, F.F.; CONRAN, N. Role for cAMP-protein kinase A signalling in augmented neutrophil adhesion and chemotaxis in sickle cell disease **European Journal of Haematology**, 79 (330-337), 2007.
- CANALLI, A.A.; CONRAN, N.; FATTORI, A.; SAAD, S.T.O.; COSTA, F.F. Increased adhesive properties of eosinophils in sickle cell disease. **Experimental Hematology**, 32; 728-734, 2004.
- CARDOSO G.L.; GUERREIRO J.F. African gene flow to north Brazil as revealed by HBB\* S gene haplotype analysis. **Am J Hum Biol**, 18(1):93-8, 2006.
- CASTRO, O.; BRAMBILLA, D.J.; THORINGTON, B.; REINDORF, C.A.; SCOTT, R.B.; GILLETTE, P.; VERA, J.C.; LEVY, P.S. The acute syndrome in sickle cell disease: incidence and risk factors. The cooperative study of sickle cell disease. **Blood**. 84: 643-649, 1994.
- CHARACHE, S.; TERRIN, M.L.; MOORE, R.D.; DOVER, G.J.; BARTON, F.B.; ECKERT, S. V.; MCMAHON, R.P.; BONDS, D.R. 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** 332 (20): 1317-22, 1995.
- CHIANG, E.Y.; FRENETTE, P.S. Sickle cell vaso-occlusion. **Hematol Oncol Clin North Am**, 19: 771-84, 2005.
- CHIANG, E.Y.; FRENETTE, P.S. Sickle cell vaso-occlusion. **Hematology/Oncology Clinics**. 19: 771-784, 2005.

- CHIANG, E.Y.; HIDALGO, A.; CHANG, J.; FRENETTE, P.S. Imaging receptor microdomains on leukocyte subsets in live mice. **Nat Methods**, 4: 219-22, 2007.
- CLARK, I. A. How TNF was recognized as a key mechanism of disease. **Cytokine Growth Factor Rev.** 18, 335–343, 2007.
- COKIC, V.P.; SMITH, R.D.; BELESLIN-COKIC, B.B.; NJOROGÉ, J.M.; MILLER, J.L.; GLADWIN, M.T.; SCHECHTER, A.N. Hydroxyurea induces fetal hemoglobin by the nitric oxide-dependent activation of soluble guanylyl cyclase. **Journal of Clinical Investigation**. 111: 231-9, 2003.
- CONRAN, N.; COSTA F.F. Hemoglobin disorders and endothelial cell interactions **Clinical Biochemistry** 42: 1824–1838, 2009.
- CONRAN, N.; FERREIRA, H.H.A.; LORAND-METZE, I.; THOMAZZI, S.M.; ANTUNES, E.; DE NUCCI, G. Nitric oxide regulates human eosinophil adhesion mechanisms *in vitro* by changing integrin expression and activity on the eosinophil cell surface. **Br. J. Pharmacol.** 134:632-638, 2001.
- CONRAN, N.; FRANCO-PENTEADO, C. F.; COSTA, F. F. Newer Aspects of the Pathophysiology of Sickle Cell Disease Vaso-Occlusion. **Hemoglobin**. 33:1,1 — 16, 2009.
- CONRAN, N.; GAMBERO, A.; FERREIRA, H.H.A.; ANTUNES, E.; NUCCI, G. Nitric oxide has a role in regulating VLA-4-integrin expression on the human neutrophil cell surface. **Biochemical Pharmacology**, 66: 43-50, 2003.
- CONRAN, N.; SAAD, S.T.O.; COSTA, F.F; IKUTA, T. Leukocyte numbers correlate with plasma levels of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in sickle cell disease. **Ann Hematol**, 86: 255-61, 2007.
- COSTA, F.F. Anemia falciforme. In: Marco Antonio Zago, Roberto Passeto Falcão, Ricardo Pasquini (editores). **Hematologia: Fundamentos e Prática**, Editora Atheneu, p.239, 2004.
- CROIZAT, H. Circulating cytokines in sickle cell patients during steady state. **Br J Haematol**, 87: 592-7, 1994.
- CROIZAT, H.; NAGEL, R.L. Circulation cytokines response and the level of erythropoiesis in in sickle cell anemia. **Am J Haematol**, 60 (2), pp. 105-115, 1999.



- De CATERINA, R.; LIBBY, P.; PENG, H.B. *et al.* Nitric oxide decreases cytokine-induced endothelial activation. Nitric oxide selectively reduces endothelial expression of adhesion molecules and proinflammatory cytokines. **J Clin Invest.** 96(2):60–68, 1995.
- De FRANCESCHI, L.; CORROCHER, R. Established and experimental treatments for sickle cell disease. **Haematologica.** 89: 348-56, 2004.
- DERIAN, C.K.; SANTULLI, R.J.; RAO, P.E.; SOLOMON, H.F.; BARRETT, J.A. Inhibition of chemotactic peptide-induced neutrophil adhesion to vascular endothelium by cAMP modulators. **J Immunol**, 154:308–17, 1995.
- DITS, A.J.; PIETERS, R.C.; SALEH, A.W.; van ROSMALEN, E.; KATERBERG, H.; BEREND, K. *et al.* Enhanced levels of soluble VCAM-1 in sickle cell patients and their specific increment during vasoocclusive crisis. **Clin Immunol Immunopathol**, 81:86-98, 1996.
- EIGENTHALER, M.; NOLTE, C.; HALBRUGGE, M.; WALTER, U. Concentration and regulation of cyclic nucleotides, cyclic-nucleotide-dependent protein kinases and one of their major substrates in human platelets. Estimating the rate of cAMP-regulated and cGMP-regulated protein phosphorylation in intact cells.. **Eur J Biochem.** 205 (2): 471-81, 1992.
- ELION, J.E.; BRUN, M.; ODIEVRE, M.H., LAPOUMÉROULIE, C.L.; KRISHNAMOORTHY, R. Vaso-occlusion in sickle cell anemia: role of interactions between blood cells and endothelium. **The Hematology Journal.** 5: S195-198, 2004.
- ETZIONI, A. Integrins: The Molecular Glue of Life. **Hospital Practice**, 2001.
- EVGENOV, O.V.; PACHER, P.; SCHMIDT, P.M.; HASKO, G.; SCHMIDT, H.H.; STASCH, J.P. NO-independent stimulators and activators of soluble guanylate cyclase: discovery and therapeutic potential. **Nat Rev Drug Discov**, 5:755-68, 2006.
- FERRONE, F.A. Polymerization and sickle cell disease: a molecular view. **Microcirculation.** 11:115–128, 2004.
- FRENETTE P. S.; ATWEH G. F. Sickle cell disease: old discoveries, new concepts, and future promise, **The Journal of Clinical Investigation**, 2007.
- FRENETTE P.S.; Sickle cell vasoocclusion: heterotypic, multicellular aggregations driven by leucocyte adhesion, **Microcirculation** 11: 167-77, 2004.

- FRENETTE, P.S. Sick cell vaso-occlusion: multistep and multicellular paradigm. *Current Opinion in Hematol*, 9: 101-6, 2002.
- GAMBERO, S.; CANALLI, A.A.; TRAINA F.; ALBUQUERQUE, D.M.; SAAD, S.T.O.; COSTA, F.F.; Therapy with hydroxyurea reduces adhesion molecule gene and protein expression in sickle red cells with a concomitant reduction in adhesive properties, *Eur J Haematol*, 78, 144-151., 2007.
- GASSON, J. Molecular physiology of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Blood* 77:1131-1145, 1991.
- GLADWIN, M.T.; SHELHAMER, J.H.; OGNIBENE, F.P.; PEASE-FYE, M.E.; NICHOLS, J.S.; LINK, B.; PATEL, D.B.; JANKOWSKI, M.A.; PANNELL, L.K.; SCHECHTER, A.N.; RODGERS, G.P. Nitric oxide donor properties of hydroxyurea in patients with sickle cell disease. *Br. J. Haematol.*, 116: 436-44, 2002.
- GOODMAN & GILMAN. As Bases Farmacológicas da Terapêutica, **Ed. Mcgraw Hill College**, 9ª edição, 1996.
- GRAIDO-GONZALEZ, E.; DOHERTY, J. C.; BERGREEN, E. W.; ORGAN, G.; TELFER, M.; MCMILLEN, M. A. Plasma endothelin-1, cytokine, and prostaglandin E2 levels in sickle cell disease and acute vaso-occlusive sickle crisis. *Blood* 92, 2551-2555., 1998.
- HAMILTON, J.A. Colony-stimulating factors in inflammation and autoimmunity. *Nat Rev Immunol*, 8: 533-44, 2008.
- HEBBEL, R.P.; MARC, M.D.; BOOGAERTS, B.; EATON, J.W.; STEINBERG, M.H. Erythrocytes adherence to endothelium in sickle cell anemia: A possible determinant of disease severity. *N. Engl. J. Med.* 302: 992, 1980.
- HEI, Y.J.; MACDONELL, K.L.; MCNEILL, J.H.; DIAMOND, J. Lack of correlation between activation of cyclic AMP-dependent protein kinase and inhibition of contraction of rat vas deferens by cyclic AMP analogs, **University of British Columbia**, 1989.
- HENSON, P.M.; JOHNSTON, R.B. Tissue injury in inflammation: oxidants, proteases and cationic proteins. *J Clin Invest* (79): 669-674, 1987.
- HERRICK, J.B. Abstract of discussion. *JAMA*. **83**:16., 1924.
- HERRICK, J.B. Peculiar elongated and sickle-shaped red blood corpuscle in a case of severe anemia. *Arch. Intern. Med.*, 6: 517-21, 1910.

- HILLERY, C.A.; DU, M.C.; WANG, W.C.; SCOTT, J.P. Hydroxyurea Therapy Decreases The *In vitro* Adhesion Of Sickle Erythrocytes To Thrombospondin And Laminin. **Br J Haematol**, 109 (2): 322-7, 2000.
- HOOVER, R.; RUBIN, R.; WISE, G.; WARREN, R. Adhesion of normal and sickle erythrocytes to endothelial monolayer cultures. **Blood**. 54: 872-876, 1979.
- HUANG, L.J.; YOON, M.H.; CHOI, J.I.; KIM, W.M.; LEE, H.G.; KIM, Y.O. Effect of sildenafil on neuropathic pain and hemodynamics in rats. **Yonsei Med J**; 51: 82-7, 2010.
- HYNES, R.O.; LANDER, A.D. Contact and adhesive specificities in the associations, migrations, and targeting of cells and axons. **Cell**, 68(2):303-22, 1992.
- IGNARRO, L.J. Nitric oxide as a unique signaling molecule in the vascular system: a historical overview. **J Physiol Pharmacol**, 53:503-514, 2002.
- IKUTA, T. ; AUSENDA, S. ; CAPPELLINI, M.D. Mechanism for fetal globin gene expression: role of the soluble guanylate cyclase-cGMP-dependent protein kinase pathway. **National Academy of Sciences of the United States of America**.98: 1847-52, 2001.
- INGRAM, V.M. Abnormal human haemoglobins. I. The comparison of normal human and sickle-cell haemoglobins by fingerprinting. **Biochim. Biophys. Acta**. 28:539–545, 1958.
- ISSEKUTZ, A.C.; ISSEKUTZ, T.B. The contribution of LFA-1 (CD11a/CD18) and MAC-1 (CD11b/CD18) to the *in vivo* migration of PMN leukocytes to inflammatory reactions in the rat. **Immunology** 76: 655-661, 1992.
- JONES, S.L. Protein kinase A regulates beta2 integrin avidity in neutrophils. **J Leukoc Bio**, 71:1042-8, 2002.
- KASSCHAU, M.R.; BARABINO, G.A.; BRIDGES, K.R.; GOLAN, D.E. Adhesion of sickle neutrophils and erythrocytes to fibronectin. **Blood**, 87: 771-780, 1996.
- KATO, G J.; GLADWIN, M.T.; STEINBERG, M.H. Deconstructing sickle cell disease: reappraisal of the role of hemolysis in the development of clinical subphenotypes. **Blood**, 21(1): 37-47, 2007.

- KEEFER, J. R.; SCHNEIDEREITH, T. A.; MAYS, A.; PURVIS, S. H.; DOVER, G. J.; SMITH, K. D. Role of cyclic nucleotides in fetal hemoglobin induction in cultured CD34 cells. **Exp. Hematol.** 34, 1151–1161, 2006.
- KOBAYASHI, Y. The role of chemokines in neutrophil biology. **Front Biosci**, 13: 2400-7, 2008.
- KRAKSTAD, C.; CHRISTENSEN, A.E.; DOSKELAND, S.O. cAMP protects neutrophils against TNF-alpha-induced apoptosis by activation of cAMP-dependent protein kinase, independently of exchange protein directly activated by cAMP (Epac). **J Leukoc Biol** 76(3): 641-7, 2004.
- KUROYANAGI, Y.; KANEKO, Y.; MUTA, K.; PARK, B. S.; MOI, P.; AUSENDA, S.; CAPPELLINI, M. D.; IKUTA, T. cAMP differentially regulates globin gene expression in erythroleukemic cells and primary erythroblasts through c-Myb expression. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 344, 1038–1047, 2006.
- LANARO, C.; FRANCO-PENTEADO C. F.; ALBUQUEQUE D. M.; SAAD S. T. O.; CONRAN N.; COSTA F. F. Altered levels of cytokines and inflammatory mediators in plasma and leukocytes of sickle cell anemia patients and effects of hydroxyurea therapy **Journal of Leukocyte Biology** Volume 85, February 2009.
- LASSMANN, G.; THELANDER, L.; GRASLUND, A. EPR stopped-flow studies of the reaction of the tyrosyl radical of protein R2 from ribonucleotide reductase with hydroxyurea. **Biochemistry and Biophysics Research Communications.** 188: 879-87, 1992.
- LORENOWICZ, M.J.; FERNANDEZ-BORJAS, M.; HORDIJK, P.L. MMMcAMP signaling in leukocyte transendothelial migration. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, 27: 1014-22, 2007.
- LUGNIER, C.; KERAUIS, T.; ECKLY-MICHEL, A. Cross talk between NO and cyclic nucleotide phosphodiesterases in the modulation of signal transduction in blood vessel. **J Physiol Pharmacol**, 50:639-652, 1999.
- LUM, A.F.; WUN, T.; STAUNTON, D.; SIMON, S.I. Inflammatory potential of neutrophils detected in sickle cell disease. **Am J Hematol**, 76:126-33, 2004.
- LUO, B.H.; CARMAN, C.V.; SPRINGER, T.A. Structural basis of integrin regulation and signaling. **Annu Rev Immunol**, 25: 619-47, 2007.

- MACHADO, R.F.; MARTYR, S.; KATO, G.J.; BARST, R.J.; ANTHI, A.; ROBINSON, M.R.; HUNTER, L.; COLES, W.; NICHOLS, J.; HUNTER, C.; SACHDEV, V.; CASTRO, O.; GLADWIN, M.T. Sildenafil therapy in patients with sickle cell disease and pulmonary hypertension. **Br J Haematol**, 130: 445-53, 2005.
- MACK, A. K.; KATO, G.J. Sickle cell disease and nitric oxide: a paradigm shift? **Int J Biochem Cell Biol**, 38(8): 1237-43, 2006.
- MEYER, R.B. Jr.; MILLER, J.P. Analogs of cyclic AMP and cyclic GMP: general methods of synthesis and the relationship of structure to enzymic activity, **Life Sci**, 14(6):1019-40, 1974.
- MILLER, S.T.; SLEEPER, L.A.; PEGELOW, C.H.; ENOS, L.E; WANG, W.C.; WEINER, S.J. *et al.* Prediction of adverse outcomes in children with sickle cell disease. **N. Engl. J. Med**, 342:83-89, 2000.
- MORRIS, C.R.; VICHINSKY, E.P.; VAN WARMERDAM, J; MACHADO, L; LARKIN, S.; KUYPERS, F.A. Hydroxyurea and arginine therapy: Impact on nitric oxide production in sickle cell disease. **Blood** suppl, 3262, 2001.
- MUKAIDA, N. Interleukin-8: an expanding universe beyond neutrophil chemotaxis and activation. **Int. J. Hematol.** 72, 391–398, 2000.
- MULLERSHAUSEN, F.; RUSSWURM, M.; FRIEBE, A.; KOESLING, D. Inhibition of phosphodiesterase type 5 by the activator of nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase BAY 41-2272. **Circulation**, 109: 1711-3, 2004.
- MURAD, F. Cellular signaling with nitric oxide and cyclic GMP. **Braz J Med Biol Res**; 32:1317–27, 1999.
- NATARAJAN, M.; UDDEN, M.M., MCINTIRE, L.V. Adhesion of sickle red blood cells and damage to interleukin-1 beta stimulated endothelial cells under flow in vitro. **Blood**. 87: 4845-4852, 1996.
- NEEL, J.V. The inheritance of sickle cell anemia. **Science**. 110:64–66, 1949.
- ONEAL, P.A.; GANTT, N.M.; SCHWARTZ, J.D.; BHANU, N.V.; LEE, Y.T.; MORONEY, J.W.; REED, C.H.; SCHECHTER, A.N.; LUBAN, N.L.C.; MILLER, J.L. Fetal hemoglobin silencing in humans. **Blood**. 108(6): 2081-2086, 2006.
- OWENS, M.A. & LOKEN, M.R. Flow cytometry principles for clinical laboratory practice. New York – EUA. **Ed. Wiley Liss**. 224p, 1995.

- PACE, B.S.; ZEIN, S. Understanding mechanisms of  $\gamma$ -globin gene regulation to develop strategies for pharmacological fetal hemoglobin induction. *Developmental. Dynamics*. 235:1727-1737, 2006.
- PAULING, L.; ITANO, H.A.; SINGER, S.J.; WELLS, I.C. Sick cell anemia: a molecular disease. *Science*, 110: 543-48, 1949
- PLATT, O.S. Sick cell anaemia as an inflammatory disease. *J Clin Invest* 106(3): 337-8, 2000.
- PLATT, O.S.; BRAMBILLA, D.J.; ROSSE, W.F.; MILNER, P.F.; CASTRO, O.; STEINBERG, M.H.; KLUG, P.P. Mortality in sick cell disease: Life expectancy and risk factors for early death. *N. Engl. J. Med.*, 330:1639-1644, 1994
- PROENÇA, R. F.; FRANCO-PENTEADO, C.F.; TRAINA, F.; SAAD, S.T.O.; COSTA, F.F.; CONRAN, N. Increased adhesive properties of platelets in sick cell disease: roles for  $\alpha 11b\beta_3$ -mediated ligand binding, diminished cAMP signalling and increased phosphodiesterase 3A activity. *Br J Haematol*, 2009.
- RAMALHO, A.S. As hemoglobinopatias hereditárias: um problema de saúde pública no Brasil. Ribeirão Preto: **Sociedade Brasileira de Genética**. v 1, 160 p., 1986.
- ROSSE, W.F.; MOHANDAS, N.; PETZ, L.D.; STEINBERG, M.H. New views of sick cell disease, pathophysiology and treatment. *Hematology* (Am Soc Hematol Educ Program): 2-17, 2000.
- SEAMON, K. B.; DALY, J. W. Forskolin: its biological and chemical properties, **ABIM - An Annotated Bibliography of Indian Medicine**, 1983
- SHIMAOKA, M.; TAKAGI, J.; SPRINGER, T.A. Conformational regulation of integrin structure and function. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*, 31:485-516, 2002.
- SIMMONDS, R. E.; FOXWELL B. M. NF $\kappa$ B and its relevance to arthritis and inflammation; *Rheumatology*;47:584–590, 2008.
- SOLOVEY A.A.; HARKNESS J.; HEBBEL R.P. Modulation of endothelial cell activation in sick cell disease: a pilot study. *Blood*, 97(7) 1937-41, 2001.
- SOLOVEY, A.; LIN, Y.; BROWNE, P.; CHOONG, S.; WAYNER, E.; HEBBEL, R.P. Circulating activated endothelial cells in sick cell anemia. *N Engl J Med*, 337(22):1584-90, 1997.

- STASCH, J.P.; BECKER, E.M.; ALONSO-ALIJA, C.; APELER, H.; DEMBOWSKY, K.; FEURER, A.; GERZER, R.; MINUTH, T.; PERZBORN, E.; PLEISS, U.; SCHRODER, H.; SCHROEDER, W.; STAHL, E.; STEINKE, W.; STRAUB, A.; SCHRAMM, M. NO-independent regulatory site on soluble guanylate cyclase. **Nature**, 410: 212-5, 2001.
- STEER, M.L.; MACINTYRE, D.E.; LEVINE, L.; SALZMAN, E.W. Is prostacyclin a physiologically important circulating anti-platelet agent? **Nature** 283: 194-5, 1980.
- STEINBERG, M.H. Management of sickle cell disease. **N Engl J Med**, 340: 1021-30, 1999.
- STEINBERG, M.H. Pathophysiologically based drug treatment of sickle cell disease. **TRENDS in Pharmacological Sciences** (27): 4, 2006.
- STEINBERG, M.H.; ADEWOYE, A.H. Modifiers genes and sickle cell anemia. **Curr Opin Hematol**, 13:131-6, 2006.
- STEINBERG, M.H.; FORGET, B.G.; HIGGS, D.R.; NAGEL, R.L. Disorders of Hemoglobin. **Cambridge University Press**, 2001.
- STUART, M.J.; NAGEL, R.L. Sickle-cell disease. **Lancet** 364: 1343-1360, 2004.
- SUGIHARA, K.; SUGIHARA, T.; MOHANDAS, N.; HEBBEL, R.P. Thrombospondin mediates adherence of CD36<sup>+</sup> sickle reticulocytes to endothelial cells. **Blood**. 80(10): 2634-2642, 1992.
- SUGIMOTO, Y.; NARUMIYA, S. Prostaglandin E receptors. **J. Biol. Chem.** 282, 11613–11617, 2007.
- SYDENSTRICKER, V.P. Further observations on sickle cell anemia. **JAMA**. 83:12–15, 1924.
- TURHAN, A.; JENAB, P.; BRUHNS, P.; RAVETCH, J.V.; COLLIER, B.S.; FRENETTE, P.S. Intravenous immune globulin prevents venular vaso-occlusion in sickle cell mice by inhibiting leukocyte adhesion and the interactions between sickle erythrocytes and adherent leukocytes. **Blood**, 103: 2397-400, 2004.
- TURHAN, A.; WEISS, L.A.; MOHANDAS, N.; COLLIER, B.S.; FRENETTE, P.S. Primary role for adherent leukocytes in sickle cell vascular occlusion: A new paradigm. **PNAS**, 99 (5): 3047-3051, 2002.

- UCHIDA, K.; TATEDA, T.; TAKAGI, S. Hypothetical mechanism of prostaglandin E1-induced bronchoconstriction. **Medical Hypotheses**, 61, 378–384, 2003.
- WATSON, J.; STAHPMAN, A.W.; BILELLO, F.P. The significance of the paucity of sickle cells in newborn Negro infants. **Am. J. Med. Sci.** 215:419–423, 1948.
- WEISS, S.J. Tissue destruction by neutrophils. **New Engl J Med** 320:356-376, 1989.
- WUNDER, F. ; TERSTEEGEN, A.; HENDRIX M., Characterization of the novel PDE9 inhibitor BAY 73-6691 using a cGMP reporter cell line, **Journal BMC Pharmacology**, 2005.
- ZAGO, M.A.; FALCÃO, R.P.; PASQUINI, R. Granulócitos. **Hematologia: Fundamentos e Prática**, Ed.Atheneu, São Paulo, pp.33-40, 2004.



**ANEXOS**

---

## 9 ANEXOS

### 9.1 **Resumo apresentado na categoria oral no Congresso Brasileiro de Hematologia e Hemoterapia em novembro de 2008 (São Paulo, Brasil).**

#### **INFLAMMATORY MEDIATORS INDUCE AUGMENTED ADHESIVE PROPERTIES IN NEUTROPHILS FROM CONTROL AND SICKLE CELL DISEASE INDIVIDUALS, IN ASSOCIATION WITH ALTERED INTRACELLULAR cAMP.**

**Lediana I. Miguel, Andréia A. Canalli, Camila B. de Almeida, Sara T.O. Saad, Fernando F. Costa, Nicola Conran.**

**Introduction:** Leukocytes play a role in the initiation and propagation of vaso-occlusion in sickle cell disease (SCD). To investigate whether the chronic inflammatory state, characteristically observed in SCD, may participate in the activation of SCD leukocytes, this study evaluated whether inflammatory mediators that are typically elevated in SCD plasma are capable of increasing the adhesive properties of neutrophils from healthy controls and from SCD patients and the signaling pathways that may be involved in this adhesion. **Methods:** Neutrophils (neu) were separated from the peripheral blood of healthy control individuals (CONneu) and SCD patients in steady state (SCDneu) over a ficoll-paque gradient. Following washing and lysis of contaminating red cells, neu were resuspended in RPMI medium and allowed to adhere to recombinant fibronectin (FN)-coated 96-well plates ( $2 \times 10^6$  cells/ml; 30 min, 37°C, 5% CO<sub>2</sub>) in the presence of inflammatory mediators. Adhesion to FN was calculated, using a standard curve, as the percentage of the original cell suspension adhered. **Results:** As previously demonstrated, SCDneu adhesion to FN is significantly higher than that of CONneu ( $18.7 \pm 2.2\%$ ;  $10.6 \pm 1.3\%$ , respect.  $N \geq 10$ ,  $P < 0.001$ ). The inflammatory mediators, prostaglandin E1 (PGE1, 10-50  $\mu$ M) and Prostaglandin E2 (PGE2, 10-50  $\mu$ M), did not significantly alter the adhesion of neither CONneu nor SCDneu to FN (results not shown,  $P > 0.05$ ). Co-incubation of neutrophils with the growth factor, GM-CSF (0,1-10 ng/ml), found in elevated levels in the plasma of our population of SCD patients, was capable of significantly increasing both CONneu and SCDneu adhesion to FN ( $11.7 \pm 2.4\%$  basal adhesion, increased to  $20.8 \pm 3.3\%$  with

100ng/ml GM-CSF; n=7,  $P<0.001$  for CONneu and  $18.7\pm3.3\%$  increased to  $36.0\pm4.5\%$  with 100ng/ml GM-CSF; n=4,  $P0.05$ ). IL-8 (500ng/ml) and IL-6 (10pg/ml) also significantly increased both CON and SCD neu adhesion to FN. CONneu adhesion increased from  $9.4\pm1.4\%$  to  $27.6\pm1.2\%$  and  $12.8\pm1.9\%$  with IL-8 and IL-6, respect. ( $n\geq3$ ,  $P<0.001$  and  $P<0.05$ , respectively). SCDneu adhesion increased from  $16.7\pm3.0\%$  to  $30.3\pm4.5\%$  and  $22.4\pm3.5\%$  with IL-8 and IL-6, respect., ( $n\geq3$ ,  $P<0.05$ ). TNF- $\alpha$  significantly increased SCDneu adhesion ( $17.9\pm3.3\%$  increased to  $38.2\pm6.2\%$  and  $39.7\pm6.8\%$  with 0.5 and 1.0  $\mu\text{g/ml}$  TNF- $\alpha$ ), but not CONneu adhesion (data not shown). Augmentation of CONneu adhesion by GM-CSF, IL-8, IL-6 and TNF- $\alpha$  is accompanied by significant increases in intracellular cAMP levels, a second messenger known to be encountered in elevated concentrations in SCDneu. Basal cAMP in CONneu was augmented by  $135.8\pm20.3\%$ ;  $127.7\pm22.1\%$ ;  $60.1\pm24.2\%$  and  $64.7\pm20.2\%$  following incubation (30 min,  $37^\circ\text{C}$ ) with 10 ng/ml GM-CSF, 500 ng/ml IL-8, 10pg/ml IL-6 and 100 ng/ml TNF- $\alpha$ , respectively.  $N\geq4$ ;  $P<0.05$ . **Conclusion:** Various inflammatory mediators found in elevated levels in the plasma of SCD individuals were observed to augment the adhesive properties of neu from both control and SCD individuals. Results indicate that the chronic inflammatory state that is characteristic of SCD may contribute to the activation of leukocytes and their augmented adhesive properties, which in turn play an important role in the vaso-occlusive process. Alterations in adhesive properties are accompanied by alterations in intracellular cAMP, a second messenger known to alter leukocyte adhesive properties. Further studies may indicate whether the cAMP-protein kinase A pathway may represent a therapeutic target for the inhibition of leukocyte adhesion to the vascular wall.

**9.2 Resumo apresentado na categoria de pôster em junho de 2009: “14<sup>th</sup> Congress of European Hematology Association, EHA” (Berlim, Alemanha).**

**INFLAMMATORY MEDIATORS INDUCE AUGMENTED ADHESIVE PROPERTIES IN NEUTROPHILS FROM CONTROL AND SICKLE CELL DISEASE INDIVIDUALS, IN ASSOCIATION WITH ALTERED INTRACELLULAR cAMP.**

**Lediania I. Miguel, Andréia A. Canalli, Camila B. de Almeida, Sara T.O. Saad, Fernando F. Costa, Nicola Conran.**

**Background:** Leukocytes play a role in the initiation and propagation of vaso-occlusion in sickle cell disease (SCD). **Aims:** To investigate whether the chronic inflammatory state, characteristically observed in SCD, may participate in the activation of SCD leukocytes, this study evaluated whether inflammatory mediators that are typically elevated in SCD plasma are capable of increasing the adhesive properties of neutrophils from healthy controls and from SCD patients and the signaling pathways that may be involved in this adhesion. **Methods:** Neutrophils (neu) were separated from the peripheral blood of healthy control individuals (CONneu) and SCD patients in steady state (SCDneu) over a ficoll-paque gradient. Following washing and lysis of contaminating red cells, neu were resuspended in RPMI medium and allowed to adhere to recombinant fibronectin (FN)-coated 96-well plates ( $2 \times 10^6$  cells/ml; 30 min, 37°C, 5% CO<sub>2</sub>) in the presence of inflammatory mediators. Adhesion to FN was calculated as the percentage of the original cell suspension adhered. **Results:** As previously demonstrated, SCDneu adhesion to FN is significantly higher than that of CONneu ( $18.7 \pm 2.2\%$ ;  $10.6 \pm 1.3\%$ , respect.  $N \geq 10$ ,  $P < 0.001$ ). The inflammatory mediators, prostaglandin E1 (PGE1, 10-50  $\mu$ M) and Prostaglandin E2 (PGE2, 10-50  $\mu$ M), did not significantly alter the adhesion of neither CONneu nor SCDneu to FN (results not shown,  $P > 0.05$ ). Co-incubation of neutrophils with the growth factor, GM-CSF (1-100 ng/ml), found in elevated levels in the plasma of our population of SCD patients, was capable of significantly increasing both CONneu and SCDneu adhesion to FN ( $11.7 \pm 2.4\%$  basal adhesion, increased to  $20.8 \pm 3.3\%$  with 100ng/ml GM-CSF;  $n=7$ ,

$P < 0.001$  for CONneu and  $18.7 \pm 3.3\%$  increased to  $36.0 \pm 4.5\%$  with 100ng/ml GM-CSF;  $n=4$ ,  $P < 0.05$ ). IL-8 (500ng/ml) and IL-6 (10pg/ml) also significantly increased both CON and SCD neu adhesion to FN. CONneu adhesion increased from  $9.4 \pm 1.4\%$  to  $27.6 \pm 1.2\%$  and  $12.8 \pm 1.9\%$  with IL-8 and IL-6, respect. ( $n \geq 3$ ,  $P < 0.001$  and  $P < 0.05$ , respectively). SCDneu adhesion increased from  $16.7 \pm 3.0\%$  to  $30.3 \pm 4.5\%$  and  $22.4 \pm 3.5\%$  with IL-8 and IL-6, respect., ( $n \geq 3$ ,  $P < 0.05$ ). TNF- $\alpha$  significantly increased SCDneu adhesion ( $17.9 \pm 3.3\%$  increased to  $38.2 \pm 6.2\%$  and  $39.7 \pm 6.8\%$  with 0.5 and 1.0  $\mu\text{g/ml}$  TNF- $\alpha$ ), but not CONneu adhesion (data not shown). Augmentation of CONneu adhesion by GM-CSF, IL-8, IL-6 and TNF- $\alpha$  is accompanied by significant increases in intracellular cAMP levels, a second messenger known to be encountered in elevated concentrations in SCDneu. Basal cAMP in CONneu was augmented by  $135.8 \pm 20.3\%$ ;  $127.7 \pm 22.1\%$ ;  $60.1 \pm 24.2\%$  and  $64.7 \pm 20.2\%$  following incubation (30 min,  $37^\circ\text{C}$ ) with 10 ng/ml GM-CSF, 500 ng/ml IL-8, 10pg/ml IL-6 and 100 ng/ml TNF- $\alpha$ , respectively.  $N \geq 4$ ;  $P < 0.05$ . **Conclusion:** Results indicate that the chronic inflammatory state that is characteristic of SCD may contribute to the activation of leukocytes and their augmented adhesive properties, which in turn play an important role in the vaso-occlusive process. Alterations in adhesive properties are accompanied by alterations in intracellular cAMP, a second messenger known to alter leukocyte adhesive properties. Further studies may indicate whether the cAMP-protein kinase A pathway may represent a therapeutic target for the inhibition of leukocyte adhesion to the vascular wall.

**9.3 Resumo apresentado na categoria de pôster em outubro de 2009 no V Simpósio Brasileiro de Doença Falciforme e outras Hemoglobinopatias em outubro de 2009 (Belo Horizonte, Minas Gerais).**

**INFLAMMATORY CYTOKINES AUGMENT THE *IN VITRO* ADHESIVE PROPERTIES OF NEUTROPHILS FROM SICKLE CELL DISEASE INDIVIDUALS AND INHIBITION OF PHOSPHODIESTERASE 9A REVERSE THIS INCREASED ADHESION**

**Lediania I. Miguel, Camila B. Almeida, Carla F. Franco-Penteado, Marcos A.C. Bezerra, Fabiola Traina, Aderson S. Araujo, Venina Marcela, Sara T.O. Saad, Fernando F. Costa, Nicola Conran**

**Introduction:** The adhesion of white cells to the vessel walls of the microcirculation has a major participation in initiation of vaso-occlusion in sickle cell disease (SCD). Nitric oxide (NO) has important inhibitory effects on cellular adhesive properties and drugs that enhance NO bioavailability or NO-cGMP-dependent signaling may hold potential for treatment of various aspects of SCD. This study aimed to observe the effect of cytokines, often found augmented in the plasma of SCD individuals, on the *in vitro* adhesive properties of neutrophils (*neu*) from healthy control (CON) and steady-state SCD (SCD) individuals. Furthermore, the effects of BAY 73-6691, an inhibitor of the cGMP-hydrolyzing enzyme, phosphodiesterase 9A (PDE9A) and BAY 41-2271, a guanylate cyclase activator, on non-stimulated and cytokine-stimulated cell adhesion were determined. **Materials and Methods:** *Neus* were isolated from peripheral blood of CON and SCD individuals. Cell adhesion ( $2 \times 10^6$  *neu*/ml in RPMI) to immobilized fibronectin (FN; 20 µg/ml) was assessed using static adhesion assays (30min, 37°C, 5%CO<sub>2</sub>) in the presence or absence of cytokines IL-8 (10-500ng/ml), TNF-α (10-100ng/ml) and GM-CSF (0,1-10ng/ml) and/or in the presence or absence of BAY 73-6691 (60 µM) or BAY-412271 (60nM) or DMSO vehicle (0.02%v/v). **Results:** As previously demonstrated, SCD*neu* have a greater capacity to adhere to FN than CON*neu* (see Table). Stimulation of cells *in vitro* with all three cytokines significantly augmented both CON*neu* adhesion to FN and further increased SCD*neu* adhesion (see Table). Co-incubation of both CON*neu* and SCD*neu* with BAY 73-6691, but not BAY

41-2271, significantly reduced their adhesions to FN (see Table). Furthermore, BAY 73-6691, but essentially not BAY 41-2271, significantly inhibited CON<sub>neu</sub> and SCD<sub>neu</sub> adhesion stimulated by IL-8, TNF- $\alpha$  and GM-CSF (see Table). DMSO vehicle had no significant effect upon CON<sub>neu</sub>/SCD<sub>neu</sub> adhesion (data not shown).

**Conclusion:** Key SCD inflammatory mediators were found, at physiologically relevant concentrations, to augment the adhesive properties of neutrophils from control and SCD individuals. Circulating inflammatory cytokines may play a role in the induction of leukocyte adhesive properties in SCD. Data suggest that elevation of intracellular cGMP may be an important approach for reducing SCD leukocyte, adhesive properties, even in an inflammatory environment. PDE9A is highly expressed in hematopoietic cells and the inhibition of this enzyme, with consequent augmentation of cGMP, may represent a tissue/cell-specific therapeutic drug target worthy of further *in vitro* and *in vivo* studies as a therapy for SCD.

**Table.** Effect of cytokine stimulation and cGMP-elevating agents upon adhesive properties of neutrophils from healthy control and steady-state SCD individuals

% Neutrophil adhesion to Fibronectin (mean±SEM)								
	Controls				SCD			
	Basal N=18	IL-8 (200 ng/ml) N≥7	TNF-α (50 ng/ml) N≥7	GM-CSF (10 ng/ml) N≥7	Basal N=18	IL-8 (200 ng/ml) N≥7	TNF-α (50 ng/ml) N≥7	GM-CSF (10 ng/ml) N≥7
Basal	16.1±1.5	26.6±2.8 * <i>p</i> <0.05	27.4±5.5 * <i>p</i> <0.05	21.4±1.6 * <i>p</i> <0.05	21.4±1.9 ⊗ <i>p</i> <0.05	32.5±3.5 * <i>p</i> <0.05	29.2±3.0 * <i>p</i> <0.05	25.2±2.2 * <i>p</i> <0.05
BAY-736691 (60μM)	13.5±2.2 # <i>p</i> <0.01	14.5±2.9 # <i>p</i> <0.001	17.4±4.6 # <i>p</i> <0.01	9.42±2.3 # <i>p</i> <0.01	15.5±1.2 # <i>p</i> <0.001	10.5±3.5 # <i>p</i> <0.001	23.2±3.1 # <i>p</i> <0.05	15.4±1.9 # <i>p</i> <0.05
BAY-412271 (60 nM)	17.5±1.9	23.6±3.8	25.8±5.0	18.2±2.1	19.2±1.2	20.4±3.5 # <i>p</i> <0.05	27.4±2.7	20.0±1.4

⊗, sig. difference comp. to control neutrophils (Mann-Whitney); \*, sig difference comp. to non-cytokine stimulated adhesion; #, sig. difference comp. to basal adhesion without co-incubation with BAY-736691/412271(Repeated measures ANOVA, Dunn post test).



**9.4 Resumo apresentado na categoria de pôster em dezembro de 2009: “51<sup>st</sup> American Society of Hematology, ASH” (New Orleans, LA, EUA).**

**INHIBITION OF PHOSPHODIESTERASE 9A (PDE9A) SIGNIFICANTLY REDUCES CYTOKINE-STIMULATED ADHESION OF NEUTROPHILS FROM SICKLE CELL DISEASE INDIVIDUALS, *IN VITRO*, BUT NOT RED CELL ADHESION**

**Lediania I Miguel, B.Sc.<sup>1\*</sup>, Camila B. Almeida, M.Sc.<sup>1\*</sup>, Carla F Franco-Penteado, Ph.D.<sup>1\*</sup>, Marcos André C Bezerra, Ph.D.<sup>1\*</sup>, Fabiola Traina, M.D., Ph.D.<sup>1\*</sup>, Venina M Dominical, B.Sc.<sup>1\*</sup>, Aderson S Araujo, M.D., Ph.D.<sup>2\*</sup>, Sara T.O. Saad, M.D, Ph.D.<sup>1</sup>, Fernando F. Costa, Ph.D., M.D.<sup>1</sup> and Nicola Conran, Ph.D.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Hematology and Hemotherapy Center, University of Campinas, Campinas, SP, Brazil;

<sup>2</sup>Hemope, Hematology and Hemotherapy Center of Pernambuco, Recife, Brazil

The adhesion of both red and white cells to the vessel walls of the microcirculation initiates vaso-occlusion in sickle cell disease (SCD). The chronic inflammatory nature of SCD leads to elevation of circulating cytokines in patients, which may contribute significantly to the activation of blood cells and their consequent adhesion. Nitric oxide (NO) has important inhibitory effects on cellular adhesive properties and drugs that enhance NO bioavailability or NO-cGMP-dependent signaling may hold potential for treatment of various aspects of SCD. This study aimed to observe the effect of cytokines, often found augmented in the plasma of SCD individuals, on the *in vitro* adhesive properties of neutrophils (*neu*) and red blood cells (RBC) from healthy control (CON) and steady-state SCD (SCD) individuals. Furthermore, the effects of BAY 73-6691, an inhibitor of the cGMP-hydrolyzing enzyme, phosphodiesterase 9A (PDE9A) and BAY 41-2271, a guanylate cyclase activator, on non-stimulated and cytokine-stimulated cell adhesion were determined. *Neus* and RBCs were isolated from peripheral blood of CON and SCD individuals. Cell adhesion ( $5 \times 10^6$  *neu*/ml in RPMI or  $2 \times 10^8$  RBC/ml in HBSS) to immobilized fibronectin (FN; 20 µg/ml) was assessed using static adhesion assays (30min, 37°C, 5%CO<sub>2</sub>) in the presence or absence of cytokines IL-8 (10-500ng/ml), TNF-alpha (10-100ng/ml) and GM-CSF (0,1-10ng/ml) and/or in the presence/absence of BAY 73-6691 (60 µM), BAY 41-2271 (60nM) or DMSO vehicle (0.02%v/v). As previously demonstrated, SCD*neu* have a greater capacity to

adhere to FN than CON*neu* (see Table). Stimulation of cells *in vitro* with all three cytokines significantly augmented both CON*neu* adhesion to FN and further increased SCD*neu* adhesion (Table). Co-incubation of both CON*neu* and SCD*neu* with BAY 73-6691, but not BAY 41-2271, significantly reduced their adhesions to FN (Table). Furthermore, BAY 73-6691, but essentially not BAY 41-2271, significantly inhibited CON*neu* and SCD*neu* adhesion stimulated by IL-8, TNF-alpha and GM-CSF (Table). DMSO vehicle had no significant effect upon *neu* adhesion (data not shown). As previously reported, SCD RBC have a greater capacity to adhere to FN, *in vitro*, compared to CON RBC ( $12.8 \pm 1.7\%$  comp.  $7.8 \pm 1.0\%$ ,  $n=7$ ,  $p<0.05$ ). However, in contrast to neutrophils, cytokines IL-8 (10-500ng/ml) and TNF-alpha (0.1-1µg/ml) did not alter the capacities of neither CON RBC nor SCD RBC to adhere to FN (200ng/ml IL-8: CON RBC,  $6.8 \pm 0.8\%$ ; SCD RBC,  $13.5 \pm 1.8\%$ ,  $n \geq 6$ ,  $p>0.05$ ) (1µg/ml TNF-alpha: CON RBC,  $7.0 \pm 1.0\%$ ; SCD RBC,  $11.4 \pm 1.9\%$ ,  $n=6$ ,  $p>0.05$ ). Furthermore, BAY 73-6691 and BAY 41-2271 did not affect either basal CON RBC (data not shown) or SCD RBC adhesion (SCD RBC basal;  $14.8 \pm 1.0\%$ ; 60µM BAY 73-6691,  $16.4 \pm 1.3\%$ ; 60nM BAY 41-2271,  $15.7 \pm 1.2\%$ ,  $n=6$ ). Key SCD inflammatory mediators were found, at physiologically relevant concentrations, to augment the adhesive properties of neutrophils, but not RBC, from control and SCD individuals. Circulating inflammatory cytokines may play a role in the induction of leukocyte adhesive properties in SCD; in contrast factors other than inflammatory stimuli may be more important for induction of SCD RBC adhesion. Data suggest that elevation of intracellular cGMP may be an important approach for reducing SCD leukocyte, but not SCD RBC, adhesive properties, even in an inflammatory environment. PDE9A is highly expressed in hematopoietic cells and inhibition of this enzyme, with consequent augmentation of cGMP, may represent a tissue/cell-specific therapeutic drug target worthy of further *in vitro* and *in vivo* studies as a therapy for SCD.

**Table.** Effect of cytokine stimulation and cGMP-elevating agents upon adhesive properties of neutrophils from healthy control and steady-state SCD individuals

% Neutrophil adhesion to Fibronectin								
(mean±SEM)								
	Controls				SCD			
	Basal	IL-8	TNF-alpha	GM-CSF	Basal	IL-8	TNF-alpha	GM-CSF
	N=18	(200ng/ml)	(50ng/ml)	(10ng/ml)	N=18	(200ng/ml)	(50ng/ml)	(10ng/ml)
		N≥7	N≥7	N≥7		N≥7	N≥7	N≥7
Basal	16.1±1.5	26.6±2.8	27.4±5.5	21.4±1.6	21.4±1.9	32.5±3.5	29.2±3.0	25.2±2.2
		* $p<0.05$	* $p<0.05$	* $p<0.05$	& $p<0.05$	* $p<0.05$	* $p<0.05$	* $p<0.05$
BAY 736691 (60µM)	13.5±2.2	14.5±2.9	17.4±4.6	9.42±2.3	15.5±1.2	10.5±3.5	23.2±3.1	15.4±1.9
	# $p<0.01$	# $p<0.001$	# $p<0.01$	# $p<0.01$	# $p<0.001$	# $p<0.001$	# $p<0.05$	# $p<0.05$
BAY 412271 (60 nM)	17.5±1.9	23.6±3.8	25.8±5.0	18.2±2.1	19.2±1.2	20.4±3.5	27.4±2.7	20.0±1.4
						# $p<0.05$		

&, comp. to control neutrophils (Mann-Whitney); \*, comp. to non-cytokine stimulated adhesion; #, comp. to basal adhesion without co-incubation with BAY-736691/412271(Repeated measures ANOVA, Dunn post test)

9.5 Artigo submetido em 07 de janeiro de 2010 – *European Journal of Haematology*

**Inhibition of Phosphodiesterase 9A (PDE9A) Significantly Reduces  
Cytokine-Stimulated *in vitro* Adhesion of Neutrophils from Sickle  
Cell Anemia Individuals**

Lediane Miguel, Camila B. Almeida, Fabiola Traina, Andreia A. Canalli, Venina M.

Dominical, Sara T. O. Saad, Fernando F. Costa, Nicola Conran

Hematology and Hemotherapy Center, School of Medicine, University of Campinas -  
UNICAMP, Brazil.

Running title: PDE9A inhibition reverses stimulated SCA neutrophil adhesion

Correspondence: Nicola Conran, Ph.D.  
Hemocentro, Rua Carlos Chagas, 480  
Cidade Universitária, Barão Geraldo  
Campinas 13083-970-SP, Brazil  
Tel: +55 19 3521 8734  
Fax: +55 19 3289 1089  
conran@unicamp.br

Financial Support: FAPESP, CNPq, Brazil

## Abstract

**Background:** Leukocyte adhesion to vessel walls plays a major role in the initiation of vaso-occlusion in sickle cell anemia (SCA). The extent to which the chronic inflammatory nature of SCA participates in leukocyte stimulation, and approaches to reverse such activation, are not well understood. **Design and Methods:** We investigated the effects of IL-8, TNF- $\alpha$  and GM-CSF cyto/chemokines on the *in vitro* adhesive properties of neutrophils (*neu*) from healthy control (CON) and steady-state SCA individuals, using static-adhesion assays with fibronectin (FN) as a ligand. Furthermore, the effects of the cGMP-elevating agents, BAY 73-6691 (inhibitor of phosphodiesterase-9A; PDE9A) and BAY 41-2271 (guanylate-cylase stimulator), on non-stimulated and cytokine-stimulated cell adhesion were determined. **Results:** SCAneu demonstrated increased adhesive properties, when compared to CONneu; however, IL-8, TNF- $\alpha$  and GM-CSF were all capable of increasing CONneu adhesion and further increasing SCAneu adhesion. BAY-736691, but not BAY-412271, significantly reduced CONneu and SCAneu adhesion to FN, this was accompanied by a decrease in the expressions of the L-selectin and CD11b (Mac-1-subunit) adhesion molecules on the SCAneu surface. Co-incubation of cytokine-stimulated neu with BAY-736691 also significantly reduced the stimulated adhesion of both CONneu and SCAneu; however this was not accompanied by alterations in adhesion molecule presentation on IL-8-stimulated SCAneu. **Conclusions:** Inflammatory molecules, commonly found elevated in SCA, may play a role in inducing leukocyte adhesive functions in SCA. Furthermore, elevation of leukocyte cGMP may be an interesting approach for the inhibition of leukocyte adhesion to the vessel wall, even in the presence of inflammatory stimuli.

**Key words:** cGMP; cytokine; inflammation; leukocyte; sickle cell anemia; vaso-occlusion

High base-line white cell counts are associated with increased mortality and augmented incidence of acute chest syndrome and silent cerebral infarcts in sickle cell disease (SCD) (1-3). Leukocytes are now thought to play a fundamental role in the vaso-occlusive process, adhering to the endothelium, and participating in reactive oxygen species (ROS) formation and inflammatory processes in the vasculature (4-6). In mice expressing human sickle hemoglobin, intravital microscopy techniques demonstrate that, following an inflammatory stimulus, leukocytes are recruited to the activated endothelium of postcapillary venules with subsequent induction of red blood cell adhesion and trapping, and eventual vaso-occlusion (7,8). In SCD individuals, leukocytes appear to exist in a primed or activated state in the circulation of individuals and, following isolation from peripheral blood, demonstrate increased adhesive properties and increased adhesion molecule expression in the presence of certain stimulating factors (9-12). It seems reasonable to assume that inflammatory processes may participate in the activation of leukocytes in SCD, but the extent to which inflammatory proteins may stimulate leukocytes, and approaches to reverse such activation, are not well understood.

Decreased nitric oxide (NO) bioavailability, due to multiple mechanisms, may contribute to a number of manifestations of SCD, including pulmonary hypertension (13); nitric oxide-dependent signaling is known to have an important inhibitory action on leukocyte adhesive molecule function (14,15) and *in vitro* experiments show that NO-donating agents can decrease the adhesive properties of SCD leukocytes in a cyclic guanosine monophosphate (cGMP)-dependent manner (16). Preliminary clinical investigations on the effects of NO-generating drugs, such as sodium nitrite, indicate that such drugs may be useful therapies for SCD (17); however, direct activation of the guanylate cyclase-cGMP signaling pathway may represent a more efficient drug target and drugs that augment soluble guanylate cyclase activity are currently under study for the treatment of pulmonary hypertension and other cardiovascular diseases (18).

In addition to the activation or stimulation of the guanylate cyclase enzyme, cGMP signaling may be amplified by inhibition of the phosphodiesterase (PDE) enzymes that are responsible for the degradation of cyclic nucleotides. Since each PDE has a different tissue/ cell type distribution, inhibitors of specific PDEs may offer a more cell-specific therapeutic approach. Sildenafil, for example, is an inhibitor of PDE5 that is present in smooth muscle cells and corpus cavernosum (19) and may hold some potential for the treatment of pulmonary hypertension and priapism in SCD (20-22). Recently, we reported that PDE9A, a cGMP-hydrolyzing PDE, is highly expressed in hematopoietic cells, particularly hematopoietic cells of SCD individuals (23). Specific

inhibition of this enzyme, in vitro, was able to augment  $\gamma$ -globin gene production in erythroleukemic cells and diminish the adhesive properties of leukocytes isolated from SCD individuals.

We, herein, investigate the effects of three inflammatory mediators, commonly encountered in augmented levels in the plasma of steady state SCD individuals, on the adhesive properties of leukocytes from healthy control individuals (CON neutrophils) and SCA individuals in steady state (SCA neutrophils). Furthermore, the influence of cGMP-elevating agents (a guanylate cyclase stimulator and a PDE9A inhibitor) on inflammatory molecule-activated neutrophils was observed.

## **Subjects and Methods**

### **Subjects**

Sickle cell anemia patients (see Table 1 for clinical details), diagnosed as homozygous for HbS (using hemoglobin electrophoresis methods and high pressure liquid chromatography), in steady-state and attended at the Hematology and Hemotherapy Center, UNICAMP, participated in the study. Patients were not in crisis and had not received blood transfusions in the preceding 3 months. None of the patients were taking NSAIDs at the time of the study and none were on hydroxyurea therapy. Healthy individuals were used as controls (aged 20–50 y). See Table for patient characteristics. 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.

### **Reagents**

Recombinant Interleukin 8 (IL-8), granulocyte macrophage-colony stimulating factor (GM-CSF) and tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) were all purchased from R&D Systems (Minneapolis, MN, USA). BAY-736691 was from Sigma Aldrich (St Louis, MO, USA) and BAY-412271 was a kind gift from Dr. Edson Antunes, Department of Pharmacology, University of Campinas, Brazil. Anti-CD62L-PE, anti-CD11b-Alexa Fluor 488 and Anti-CD11a-PE were all purchased from BD Pharmingen (San Jose, CA, USA). All other reagents were bought from Sigma Aldrich unless otherwise stated.

## **Neutrophil separation**

Neutrophils were separated from fresh peripheral blood collected in sodium citrate, by centrifuging over two layers of Ficoll-Paque of densities of 1.077 and 1.119 g/l (24). After lysis of contaminating erythrocytes by resuspension of the cell pellet in lysis buffer (155 mM NH<sub>4</sub>Cl, 10 mM KHCO<sub>3</sub>, 40C, 10 min), cells were washed in phosphate buffered saline (PBS) before resuspending in RPMI medium for immediate use in assays.

## **Neutrophil adhesion assays**

Neutrophil static adhesion assays were performed as previously described (9). Briefly, neutrophils (2×10<sup>6</sup> cells/mL in RPMI medium) were seeded onto 96-well plates previously coated with 20µg/mL fibronectin; cells were allowed to adhere for 30 min at 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Following incubation, non-adhered cells were discarded and wells washed thrice with PBS. RPMI (50µL) was added to each well and varying concentrations of the original cell suspension were added to empty wells to form a standard curve. Percentage cell adhesion was calculated by measuring the myeloperoxidase content (25) of each well and comparing with the appropriate standard curve. Cells were co-incubated with cytokine, in the presence or absence of cGMP-elevating agents during the adhesion assay.

## **Flow Cytometry**

Isolated neutrophils (4×10<sup>6</sup> cells/ml) were incubated (60 min, 37°C) in the presence or absence of IL-8, TNF-α or GM-CSF and/or cGMP-generating agent (60 µM BAY 73-6691 or 150 nM BAY 41-2272) before incubating with a saturating concentration of PE-conjugated anti-CD62L (L-selectin), Alexa Fluor 488-conjugated anti-CD11b (α-subunit of the Mac-1 integrin) or PE-conjugated anti-CD11a (α-subunit of the LFA-1 integrin) (30 min, 40°C). Cells were washed once in PBS and then fixed in 1% paraformaldehyde, before analyzing on a FACScalibur (BD, New Jersey). SSC/FSC dot plots were used to gate the neutrophil population. The mean fluorescence intensity of antibody binding to each cell was compared to that of isotype controls.



## **Statistical Analysis**

Data are reported as the mean and SEM of *n* subjects. Data for different groups of individuals were compared by the Student *t* test. Effects of different cytokines or cGMP-elevating agents were compared by repeated measures ANOVA followed by the Bonferroni post test. Differences were considered to be significant when  $p < 0.05$ .

## **Results**

### **Stimulation of neutrophils with inflammatory proteins further augments their adhesive properties**

As previously reported (16), neutrophils isolated from SCA individuals demonstrate an increased capacity to adhere to fibronectin (FN) ligand, under static in vitro conditions, when compared to control (CON) individual neutrophils (Figure 1A). Both CON neutrophils and SCA neutrophils were incubated with cytokines that are commonly found in elevated levels in the circulation of SCA individuals. Cells were incubated with IL-8 (10-500 ng/ml), TNF- $\alpha$  (10-100 ng/ml) and GM-CSF (0.1-10 ng/ml). All of these inflammatory proteins were found to significantly increase both CON and SCA neutrophil adhesion to FN ( $p < 0.05$ ); results for representative concentrations of these molecules are depicted in Figure 1 B and C.

### **Inhibition of PDE9A activity reverses the effects of cytokine stimulation upon neutrophil adhesion, in vitro**

Control and SCA neutrophils were incubated in the absence or presence of IL-8, TNF- $\alpha$  and GM-CSF and also co-incubated with the PDE9A inhibitor, BAY-736691 (60  $\mu$ M) or the guanylate cyclase stimulator, BAY-412271 (150 nM). BAY-736691, but not BAY-412271, was able to significantly decrease both CON and SCA non-stimulated neutrophil adhesion to FN (Figure 2A). Similarly, when both CON and SCA neutrophils were stimulated with either IL-8 (Figure 2B), TNF- $\alpha$  (Figure 2C) or GM-CSF (Figure 2D), BAY-736691 was able to reverse the effect of cytokine stimulation upon neutrophil adhesion. A significant effect of BAY-412271 was only observed on IL-8-stimulated adhesion of SCA neutrophils to FN (Figure 2B). Stimulated and non-stimulated cells were also incubated with DMSO vehicle at the same concentration as that used for

drugs (0.1 % v/v); DMSO did not significantly alter the adhesion of neither control nor SCA neutrophils to FN (data not shown,  $p > 0.05$ ).

### **Inhibition of PDE9A activity decreases the presentation of adhesion molecules on the surface of SCA neutrophils**

Surface expressions of the adhesion molecules, CD62L (L-selectin), CD11b (Mac-1  $\alpha$  subunit) and CD11a (LFA-1  $\alpha$  subunit) were determined on CON and SCA neutrophils. The expression of CD62L was significantly higher on the surface of SCA neutrophils, compared to CON neutrophils (Figure 3A), whilst CD11b expression was observed to be slightly, but not significantly, higher on the surface of SCA neutrophils (Figure 3B). In comparison, the surface expression of CD11a was not altered on the surface of SCA neutrophils (Figure 3C). Incubation of SCA neutrophils with BAY-736691 (60 min, 37°C), but not BAY-412271, significantly decreased the presentation of CD62L and CD11b, but not CD11a, on the cell surface (Figure 3).

### **Inhibition of PDE9A activity does not alter the presentation of surface adhesion molecules on SCA neutrophils following IL-8 stimulation**

Following stimulation of SCA neutrophils with IL-8 (200 ng/ml, 60 min), the surface expressions of CD62L and CD11b were not significantly altered (Figure 4 A and B); in contrast, IL-8 significantly increased the surface expression of CD11a on the SCA neutrophil surface (Figure 4C). However, co-incubation of SCA neutrophils with both IL-8 and either BAY-736691 (60  $\mu$ M) or BAY-412271 (150 nM) did not significantly affect the presentation of these molecules on the SCA neutrophil surface, when compared to cells stimulated with just IL-8 (Figure 4).

## **Discussion**

The vaso-occlusive process is initiated primarily by the adhesion of both red and white cells to the vascular wall (5); however, the role that inflammation plays in these adhesive interactions is poorly understood. SCD is now recognized to constitute a chronic inflammatory disease and the cyto/chemokines IL-8, TNF- $\alpha$  and GM-CSF are just some of inflammatory molecules known to be augmented in the circulation of SCD individuals (4,26,27). Each of these inflammatory molecules was found to induce the adhesion of both control and SCA neutrophils to immobilized fibronectin ligand. In a

previous study, we found that, in addition to IL-8, IL-6 and granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF) can also augment SCA neutrophil adhesion to fibronectin (9); thus, data indicate that numerous inflammatory molecules are capable of inducing SCA neutrophil adhesion.

In our population of patients, plasma levels of approximately 5-60 pg/ml IL-8, 1-7.5 pg/ml TNF- $\alpha$  and 0.05-1.8 pg/ml GM-CSF have been observed, using ELISA (4,26) and it seems reasonable to assume that levels of inflammatory molecules are probably more concentrated in vessels at sites of inflammation. As such, concentrations of cytokines utilized in the present study are probably physiologically relevant. Neutrophils are the first cells to be recruited to sites of inflammation, where IL-8 (CXCL8) is one of the most important molecules involved in such recruitment (28). TNF- $\alpha$  stimulation has been demonstrated to initiate the adhesion of leukocytes to the vessel wall, as well as augment red blood cell-leukocyte interactions, in the cremastic venules of sickle cell mice (7,8). In addition to the known function of GM-CSF as a regulator of granulocyte and macrophage lineages, this cytokine is now recognized to participate in inflammatory mechanisms (29). GM-CSF is expressed at higher levels at sites of inflammation and appears to activate cells such as neutrophils, causing them to increase their production of other inflammatory molecules, such as IL-8, and increasing survival and functions such as adhesion (29). Thus, data demonstrating that IL-8, TNF- $\alpha$  and GM-CSF increase the adhesion of neutrophils and further increase SCA neutrophil adhesive properties lend support to the theory that these inflammatory molecules, amongst others, may contribute to the adhesive interactions between leukocytes and the vessel wall, and therefore, the vaso-occlusive process.

To understand some of the molecular signaling mechanisms that may be targeted to reduce leukocyte adhesion in the vessels of SCD individuals, we co-incubated neutrophils with two cGMP-elevating agents, BAY-736691 that inhibits PDE9A, and BAY-412271, a guanylate cyclase stimulating agent. Previous studies indicate that stimulation of NO/cGMP-dependent signalling may reduce the expression and/or function of integrins on the surface of leukocytes (14,16). At the concentration employed, BAY-736691 significantly decreased both control and SCA neutrophil adhesion to fibronectin; this effect was accompanied by a decrease in the presentation of the L-selectin (CD62L) adhesion molecule, important for the rolling function of leukocytes, and also by a decrease in CD11b (Mac-1 integrin subunit) on the surface of non-stimulated cells. BAY-736691 also significantly reduced the adhesion of IL-8, TNF- $\alpha$  and GM-CSF-stimulated SCA neutrophils to FN; however, significant alterations in the expressions of adhesion molecules were not observed on IL-8-stimulated SCA

neutrophils that were co-incubated with BAY-736691. Data suggest that in non-stimulated SCA neutrophils, BAY-736691 may reduce cell adhesion, at least in part, by decreasing the presentation of adhesion molecules, such as Mac-1, on the cell surface; whether this occurs by an induction of protein shedding, or another mechanism, remains to be clarified. In contrast, BAY-736691 failed to reduce adhesion molecule presentation on the surface of IL-8-stimulated SCA neutrophils, but significantly reduced cell adhesion. The participation of integrins, such as Mac-1, in neutrophil adhesion depends not only on the expression of this protein but also upon the affinity conformation of these molecules (30). Therefore, cytokines, such as IL-8, may augment SCA neutrophil adhesion by increasing adhesion molecule function (i.e. affinity), as well as by increasing adhesion molecule expression. In turn, BAY-736691 may reduce cytokine-stimulated SCA neutrophil adhesion by decreasing the ligand affinity of adhesion molecules, rather than decreasing protein expression or presentation.

Incubation of cells with the guanylate cyclase stimulator, BAY-412271, did not have a significant effect on the adhesive properties of non-stimulated control and SCA neutrophils, in the present studies. When SCA neutrophils were stimulated with IL-8 and co-incubated with BAY-412271 a reduction in inhibition was observed, although this decrease was not as significant as that seen when the same cells were co-incubated with BAY-736691. BAY-412271 was used in the present studies at concentrations of 60 and 150 nM. The effective concentration of this agent is reported to vary between nanomolar levels to micromolar levels; however the IC<sub>50</sub> of BAY-412271 for the inhibition of platelet aggregation is 36 nM (31), and millimolar concentrations of this compound have been suggested to inhibit other enzymes, such as PDE5, in addition to the guanylate cyclase enzyme (32,33); as such, we believe that the concentration of this agent utilized was adequate for the objectives of this study.

Thus, results lend support to the idea that inflammatory molecules generated at sites of inflammation may play a role in inducing the adhesion of leukocytes to the vessel wall in SCD. The elevation of levels of intracellular cGMP in leukocytes may be an interesting approach for inhibiting the adhesion of these cells to the vessel wall, and therefore reduce vaso-occlusive mechanisms, even in the presence of an inflammatory stimulus. Whilst cGMP-elevating drugs, such as sildenafil, have been advocated for the treatment of some manifestations of SCD, including pulmonary hypertension (20), recent data suggest that cGMP-dependent signaling may mediate mechanisms of neuropathic pain (34). Agents that elevate cGMP in specific cell types may, thus, hold promise for use in SCD therapy. BAY-736691 specifically inhibits PDE9A, an enzyme that appears to be highly expressed in hematopoietic cells and future studies may

determine whether this agent may be a useful approach for diminishing leukocyte adhesion in SCA.

## **Acknowledgments**

The authors thank Fernanda Perreira Cunha for assistance with flow cytometry procedures. This study was supported by FAPESP and CNPq, Brazil. The Hematology and Hemotherapy Center, UNICAMP, forms part of the National Institute of Blood, Brazil (INCT de Sangue, CNPq/MCT/FAPESP).

## References

- 1 Castro O, Brambilla DJ, Thorington B, Reindorf CA, Scott RB, Gillette P, Vera JC, Levy PS. The acute chest syndrome in sickle cell disease: incidence and risk factors. The Cooperative Study of Sickle Cell Disease. *Blood* 1994; **84**: 643-9.
- 2 Kinney TR, Sleeper LA, Wang WC, Zimmerman RA, Pegelow CH, Ohene-Frempong K, Wethers DL, Bello JA, Vichinsky EP, Moser FG, Gallagher DM, DeBaun MR, Platt OS, Miller ST. Silent cerebral infarcts in sickle cell anemia: a risk factor analysis. The Cooperative Study of Sickle Cell Disease. *Pediatrics* 1999; **103**: 640-5.
- 3 Miller ST, Sleeper LA, Pegelow CH, Enos LE, Wang WC, Weiner SJ, Wethers DL, Smith J, Kinney TR. Prediction of adverse outcomes in children with sickle cell disease. *New Eng J Med* 2000; **342**: 83-9.
- 4 Lanaro C, Franco-Penteado CF, Albuquerque DM, Saad ST, Conran N, Costa FF. Altered levels of cytokines and inflammatory mediators in plasma and leukocytes of sickle cell anemia patients and effects of hydroxyurea therapy. *J Leukoc Biol* 2009; **85**: 235-42.
- 5 Chiang EY, Frenette PS. Sickle cell vaso-occlusion. *Hematol Oncol Clin North Am* 2005; **19**: 771-84.
- 6 Conran N, Costa FF. Hemoglobin disorders and endothelial cell interactions. *Clin Biochem* 2009; **42**: 1824-38.
- 7 Turhan A, Jenab P, Bruhns P, Ravetch JV, Collier BS, Frenette PS. Intravenous immune globulin prevents venular vaso-occlusion in sickle cell mice by inhibiting leukocyte adhesion and the interactions between sickle erythrocytes and adherent leukocytes. *Blood* 2004; **103**: 2397-400.
- 8 Turhan A, Weiss LA, Mohandas N, Collier BS, Frenette PS. Primary role for adherent leukocytes in sickle cell vascular occlusion: a new paradigm. *Proc Nat Acad Sci USA* 2002; **99**: 3047-51.
- 9 Assis A, Conran N, Canalli AA, Lorand-Metze I, Saad ST, Costa FF. Effect of cytokines and chemokines on sickle neutrophil adhesion to fibronectin. *Acta Haematol* 2005; **113**: 130-6.
- 10 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**: 330-7.
- 11 Fadlon E, Vordermeier S, Pearson TC, Mire-Sluis AR, Dumonde DC, Phillips J, Fishlock K, Brown KA. Blood polymorphonuclear leukocytes from the majority of sickle cell patients in the crisis phase of the disease show enhanced adhesion to vascular endothelium and increased expression of CD64. *Blood* 1998; **91**: 266-74.
- 12 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**: 81-8.
- 13 Kato GJ, Hebbel RP, Steinberg MH, Gladwin MT. Vasculopathy in sickle cell disease: Biology, pathophysiology, genetics, translational medicine, and new research directions. *Am J Hematol* 2009; **84**: 618-25.
- 14 Conran N, Ferreira HH, Lorand-Metze I, Thomazzi SM, Antunes E, de Nucci G. Nitric oxide regulates human eosinophil adhesion mechanisms in vitro by changing integrin expression and activity on the eosinophil cell surface. *Br J Pharmacol* 2001; **134**: 632-8.

- 15 Conran N, Gambero A, Ferreira HH, Antunes E, de Nucci G. Nitric oxide has a role in regulating VLA-4-integrin expression on the human neutrophil cell surface. *Biochem Pharmacol* 2003; **66**: 43-50.
- 16 Canalli AA, Franco-Penteado CF, Saad ST, Conran N, Costa FF. Increased Adhesive Properties of Neutrophils in Sick Cell Disease May Be Reversed by Pharmacological Nitric Oxide Donation. *Haematologia* 2008; **93**: 605-9.
- 17 Mack AK, McGowan Li VR, Tremonti CK, Ackah D, Barnett C, Machado RF, Gladwin MT, Kato GJ. Sodium nitrite promotes regional blood flow in patients with sickle cell disease: a phase I/II study. *Br J Haematol* 2008.
- 18 Schmidt HH, Schmidt PM, Stasch JP. NO- and haem-independent soluble guanylate cyclase activators. *Handb Exp Pharmacol* 2009; 309-39.
- 19 Bender AT, Beavo JA. Cyclic nucleotide phosphodiesterases: molecular regulation to clinical use. *Pharmacol Rev* 2006; **58**: 488-520.
- 20 Machado RF, Martyr S, Kato GJ, Barst RJ, Anthi A, Robinson MR, Hunter L, Coles W, Nichols J, Hunter C, Sachdev V, Castro O, Gladwin MT. Sildenafil therapy in patients with sickle cell disease and pulmonary hypertension. *Br J Haematol* 2005; **130**: 445-53.
- 21 Burnett AL, Bivalacqua TJ, Champion HC, Musicki B. Feasibility of the use of phosphodiesterase type 5 inhibitors in a pharmacologic prevention program for recurrent priapism. *J Sex Med* 2006; **3**: 1077-84.
- 22 Claudino MA, Franco-Penteado CF, Corat MA, Gimenes AP, Passos LA, Antunes E, Costa FF. Increased cavernosal relaxations in sickle cell mice priapism are associated with alterations in the NO-cGMP signaling pathway. *J Sex Med* 2009; **6**: 2187-96.
- 23 Almeida CB, Traina F, Lanaro C, Canalli AA, Saad ST, Costa FF, Conran N. High expression of the cGMP-specific phosphodiesterase, PDE9A, in sickle cell disease (SCD) and the effects of its inhibition in erythroid cells and SCD neutrophils. *Br J Haematol* 2008; **142**: 836-44.
- 24 English D, Andersen BR. Single-step separation of red blood cells. Granulocytes and mononuclear leukocytes on discontinuous density gradients of Ficoll-Hypaque. *J Immunol Methods* 1974; **5**: 249-52.
- 25 Bradley PP, Priebat DA, Christensen RD, Rothstein G. Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker. *J Invest Dermatol* 1982; **78**: 206-9.
- 26 Conran N, Saad ST, Costa FF, Ikuta T. Leukocyte numbers correlate with plasma levels of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in sickle cell disease. *Ann Hematol* 2007; **86**: 255-61.
- 27 Croizat H. Circulating cytokines in sickle cell patients during steady state. *Br J Haematol* 1994; **87**: 592-7.
- 28 Kobayashi Y. The role of chemokines in neutrophil biology. *Front Biosci* 2008; **13**: 2400-7.
- 29 Hamilton JA. Colony-stimulating factors in inflammation and autoimmunity. *Nat Rev Immunol* 2008; **8**: 533-44.
- 30 Luo BH, Carman CV, Springer TA. Structural basis of integrin regulation and signaling. *Annu Rev Immunol* 2007; **25**: 619-47.
- 31 Stasch JP, Becker EM, Alonso-Alija C, Apeler H, Dembowski K, Feurer A, Gerzer R, Minuth T, Perzborn E, Pleiss U, Schroder H, Schroeder W, Stahl E, Steinke W, Straub A, Schramm M. NO-independent regulatory site on soluble guanylate cyclase. *Nature* 2001; **410**: 212-5.

- 32 Bischoff E, Stasch JP. Effects of the sGC stimulator BAY 41-2272 are not mediated by phosphodiesterase 5 inhibition. *Circulation* 2004; **110**: e320-1; author reply e-1.
- 33 Mullershausen F, Russwurm M, Friebe A, Koesling D. Inhibition of phosphodiesterase type 5 by the activator of nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase BAY 41-2272. *Circulation* 2004; **109**: 1711-3.
- 34 Huang LJ, Yoon MH, Choi JI, Kim WM, Lee HG, Kim YO. Effect of sildenafil on neuropathic pain and hemodynamics in rats. *Yonsei Med J*; **51**: 82-7

**Table.** Clinical characteristics of healthy controls and sickle cell anemia patients participating in studies.

	CONTROL	SCA
<b>Male/Female</b>	29/12	15/32
<b>Age (years)</b>	34 (32; 18; 55)	37 (38; 17; 65)
<b>RBC count (x10<sup>12</sup>/ L)</b>	N/D	2.8 (2.7; 1.6; 5.1)
<b>Hematocrit (%)</b>	44 (43; 39; 50)	24.6 (24.5; 15.6; 33.6)
<b>Hemoglobin (g/L)</b>	N/D	8.2 (8.2; 5.6; 10.6)
<b>Mean corpuscular volume (fl)</b>	N/D	89.3 (91.1; 64.8; 105.1)
<b>Mean corpuscular hemoglobin (pg)</b>	N/D	29.8 (30.1; 20.5; 36.4)
<b>WBC (x10<sup>9</sup>/L)</b>	N/D	10.5 (10.2 ; 3.9 ; 18.2)
<b>Platelets (x10<sup>9</sup>/L)</b>	N/D	457.9 (463.0; 190.5; 1325.0)
<b>HbF (%)</b>	N/D	7.5 (6.2 ; 0.5 ; 19.7)

Controls, healthy control individuals (AA); SCA, steady-state SCA individuals not on HU therapy; HbF, fetal hemoglobin; RBC, red blood cell; N/D, not determined. Data presented (except m/F value) as mean (median, min, max).



## Figure Legends

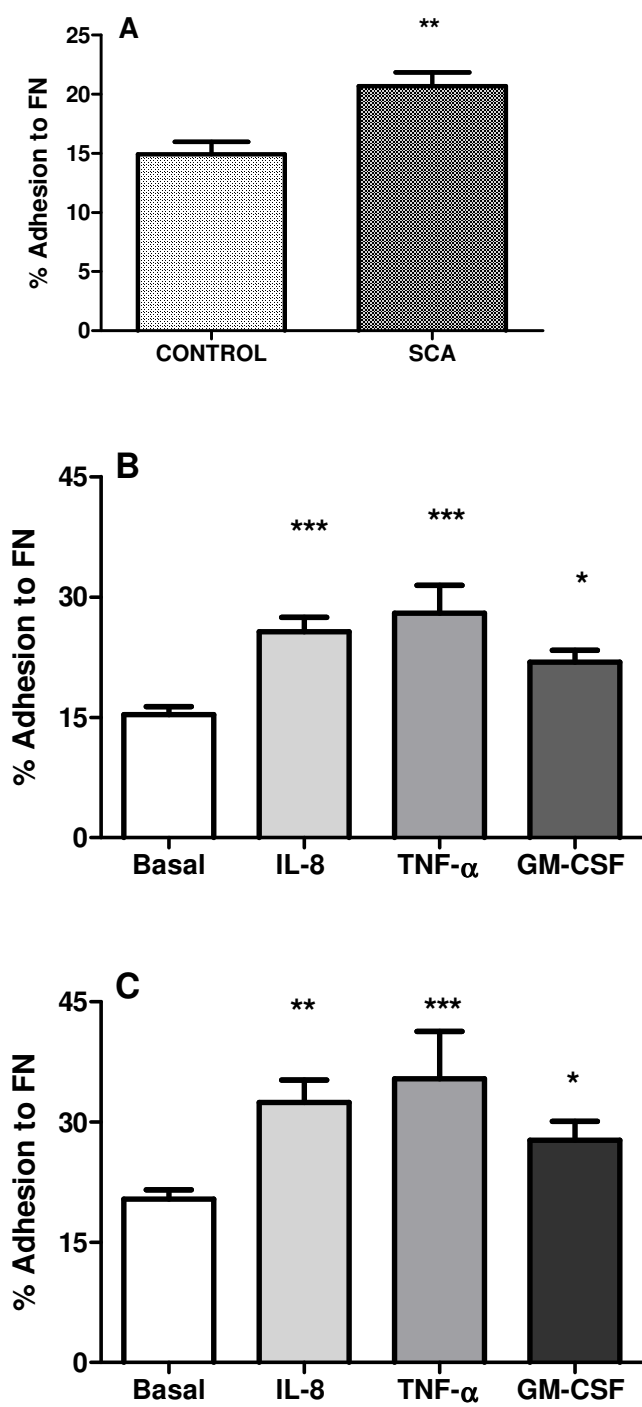
**Figure 1. (A)** Basal adhesion of neutrophils from control (CON) and steady state SCA (SCA) individuals to FN (30 min, 37°C, 5%CO<sub>2</sub>). \*\*, P<0.01 compared to CON; N≥22. Adhesion of neutrophils from control **(B)** and steady-state SCA **(C)** individuals when stimulated with 200 ng IL-8, 100 ng/ml TNF-α and 10 ng/ml GM-CSF (30 min, 37°C, 5%CO<sub>2</sub>). Results are presented as means ± SEM; \*, P<0.05; \*\*, P<0.01; \*\*\*, P<0.001, compared to basal adhesion. N≥13 for B; N≥7 for C.

**Figure 2.** Adhesion of healthy control (CON) and steady-state SCA (SCA) neutrophils to FN (30 min, 37°C, 5%CO<sub>2</sub>) when unstimulated **(A)** or stimulated with 200 ng/ml IL-8 **(B)**, 100 ng/ml TNF-α **(C)** or 10 ng/ml GM-CSF **(D)**, in the presence or absence of 60 μM BAY-736691 or 150 nM BAY-412271. \*, P<0.05; \*\*\*, P<0.001, comparing SCA with CON; #, P<0.05; ##, P<0.01, comparing cytokine-stimulated with non-stimulated basal adhesion. •, P<0.01; ••, P<0.01; •••, P<0.001, comparing BAY-736691/BAY-412271-treated cells with non-treated cells. Results are presented as means ± SEM; N≥15 for A; N≥8 for B; N≥11 for C; N≥9 for D.

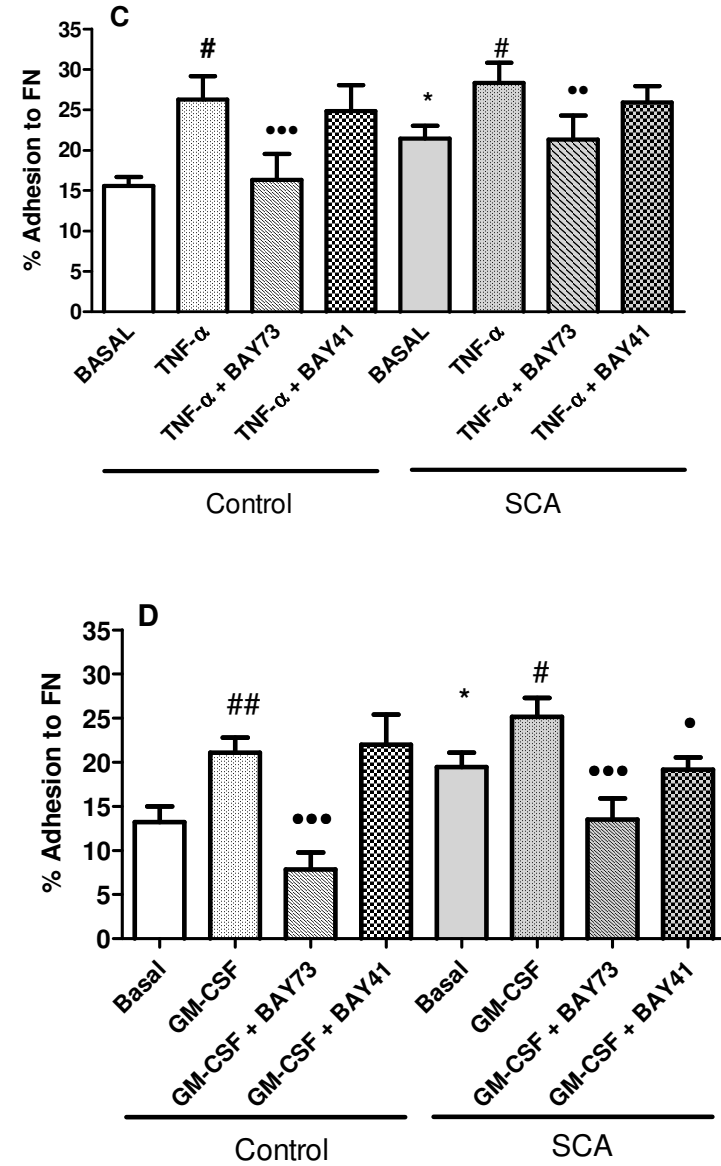
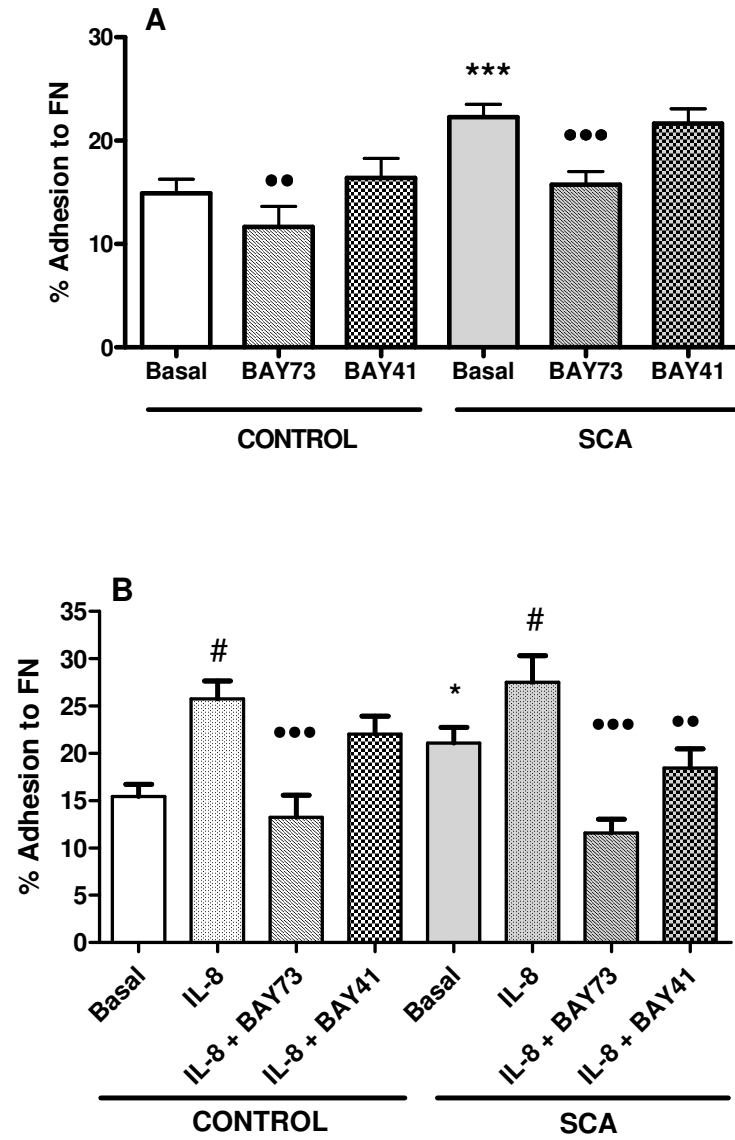
**Figure 3.** Effects of BAY-736691 (60 μM) and BAY-412271 (150 nM) on the presentation of **(A)** CD62L, **(B)** CD11b and **(C)** CD11a on the surface of neutrophils from healthy control (CON) and steady-state SCA (SCA) individuals. Cells were incubated with agents for 60 min, 37°C, 5%CO<sub>2</sub> before determining protein expression by flow cytometry. Mean Fluorescence Intensity (MFI) was determined for anti-adhesion molecule antibody binding on 10 000 cells, as described. \*\*\*, P<0.001, comparing BAY-736691-treated cells with basal adhesion. ###, P<0.001, comparing BAY-736691-treated cells with BAY-412271-treated cells. Results are presented as means ± SEM; N≥ 7 for A, B and C.

**Figure 4.** Effects of BAY-736691 (60 μM) and BAY-412271 (150 nM) on the presentation of **(A)** CD62L, **(B)** CD11b and **(C)** CD11a on the surface of healthy control (CON) and steady-state SCA (SCA) neutrophils stimulated with IL-8 (200 ng/ml). Cells were incubated with agents for 60 min, 37°C, 5%CO<sub>2</sub> in the presence or absence of agents and IL-8, before determining protein expression by flow cytometry. Mean Fluorescence Intensity (MFI) was determined for anti-adhesion molecule antibody

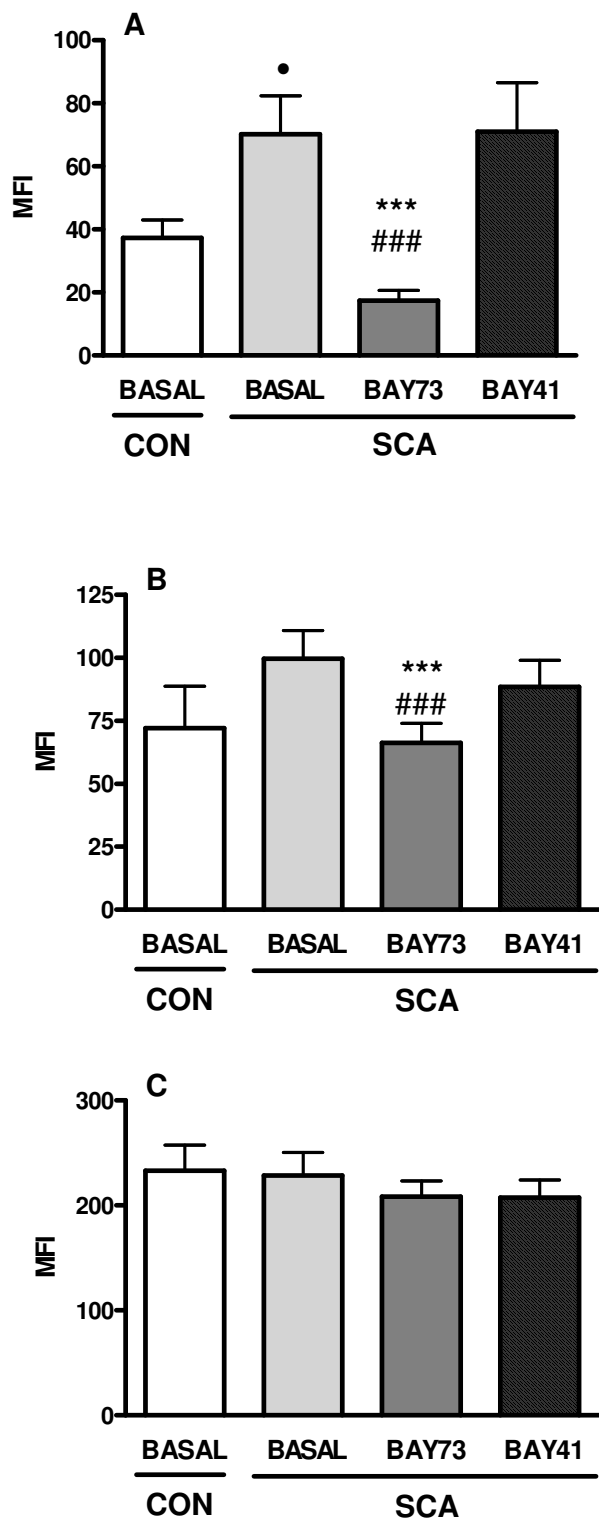
binding on 10 000 cells, as described. \*,  $P < 0.05$ , comparing IL-8 stimulated cells with non-stimulated. Results are presented as means  $\pm$  SEM;  $N \geq 5$  for A, B and C.



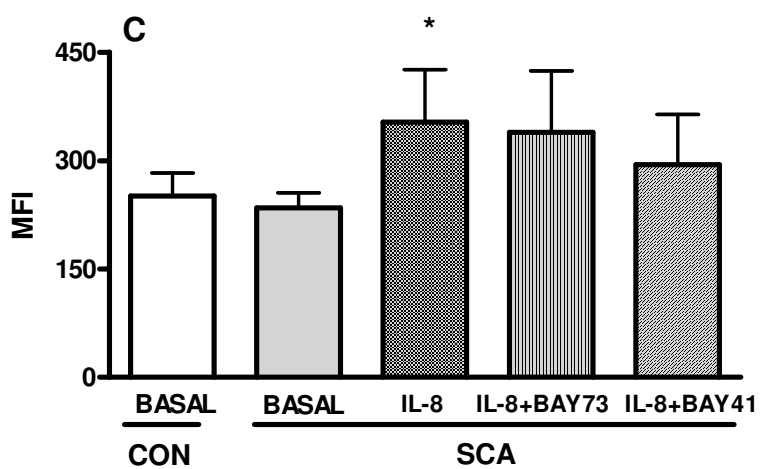
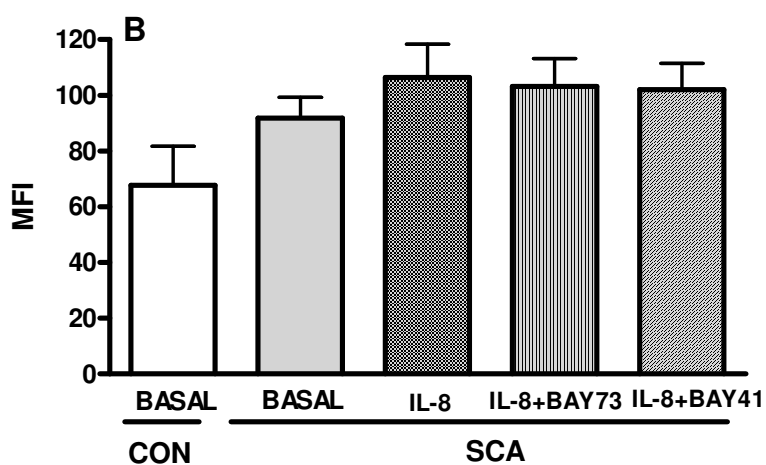
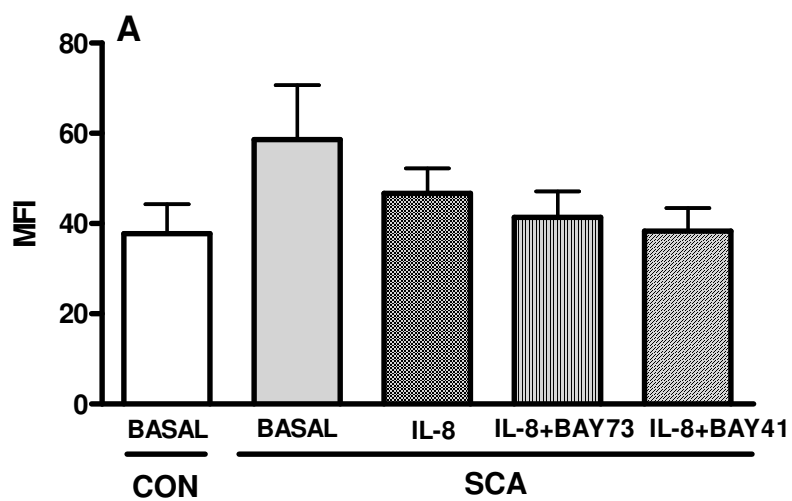
**Figure 1**



**Figure 2**



**Figure 3**



**Figure 4**