

JOSÉ FERNANDO DE ALMEIDA NORONHA

**AVALIAÇÃO DAS PLAQUETAS RETICULADAS
NAS SÍNDROMES FALCIFORMES**

CAMPINAS

2007

JOSÉ FERNANDO DE ALMEIDA NORONHA

**AVALIAÇÃO DAS PLAQUETAS RETICULADAS
NAS SÍNDROMES FALCIFORMES**

*Tese de Doutorado apresentada à Pós-Graduação da
Faculdade de Ciências Médicas da Universidade
Estadual de Campinas para obtenção do título de
Doutor em Ciências Médicas, área de concentração
Ciências Biomédicas*

ORIENTADORA: Profª Drª. HELENA ZERLOTTI WOLF GROTTO

CAMPINAS

2007

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

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

N789a	<p>Noronha, José Fernando de Almeida Avaliação das plaquetas reticuladas nas síndromes falciformes / José Fernando de Almeida Noronha. Campinas, SP: [s.n.], 2007.</p> <p style="text-align: center;">Orientador: Helena Zerlotti Wolf Grotto Tese (Doutorado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.</p> <p style="text-align: center;">1. Anemia Falciforme. 2. Plaquetas (Sangue). 3. Citocinas. I. Grotto, Helena Zerlotti Wolf. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.</p>
-------	----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

**Título em inglês: Evaluation of reticulated platelets in patients with sickle cell
diseases**

Keywords: • Sickle cell disease
• Platelets
• Cytokines

Área de concentração: Ciências Biomédicas

Titulação: Doutorado em Ciências Médicas

Banca examinadora: Profa. Dra. Helena Zerlotti Wolf Grotto

Profa. Dra. Maria de Fátima Sonati

Prof Dr Vagner de Castro

Profa. Dra. Leila Antonangelo

Prof Dr Elbio Antônio D´Amico

Data da defesa: 08-02-2007

Banca examinadora da tese de Doutorado

Orientador(a): Prof(a). Dr(a). Helena Zerlotti Wolf Grotto

Membros:

1. Profa. Dra. Helena Zerlotti Wolf Grotto – 

2. Profa. Dra. Leila Antonangelo – 

3. Prof. Dr. Elbio Antonio D'Amico – 

4. Profa. Dra. Maria de Fátima Sonati – 

5. Prof. Dr. Vagner de Castro – 

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

Data: 08/02/2007

*À minha mãe
Irenice,
à minha companheira
Márcia e filhos
Isabella e Victor,
pelo estímulo e confiança,
à minha orientadora
Dra Helena
pela paciência e palavras amigas
nos momentos que precisei,
à Deus
pela força e o amor.*

AGRADECIMENTOS

À Profa Dra Helena Zerlotti Wolf Grotto, pela constante dedicação, paciência, apoio e sabedoria.

Aos professores da Faculdade de Ciências Médicas que, direta ou indiretamente, contribuíram para minha formação.

À Profa. Dra. Irene G Lorand-Metze, que gentilmente permitiu que as avaliações feitas por citometria de fluxo fossem realizadas no Laboratório e Marcadores Celulares do HEMOCENTRO/UNICAMP, sob sua coordenação.

A todos os pacientes do ambulatório de Hemoglobinopatias do HEMOCENTRO-UNICAMP, que foram solícitos durante a abordagem.

Aos colegas de Pós-Graduação, Michele, Laudicéia, Fernanda e Ronei, pelo auxílio técnico e didático.

À todos os colegas do Departamento de Patologia Clínica e HEMOCENTRO –UNICAMP, que contribuíram para realização deste trabalho científico.

Aos funcionários Alan e Fernanda do Laboratório e Marcadores Celulares do HEMOCENTRO/UNICAMP, pela contribuição e compreensão.

Aos meus amigos do Laboratório de Hematologia da Divisão de Patologia Clínica do HC-UNICAMP, pelo constante apoio e compreensão.

À Dra Nydia Bacal e os funcionários do Laboratório de Citometria de Fluxo do Hospital Israelita Albert Einstein, pela oportunidade de estágio curricular.

	<i>Pág.</i>
RESUMO	xxv
ABSTRACT	xxix
1- INTRODUÇÃO	33
1.1- Trombopoiese	35
1.2- Plaquetas	37
1.3- Método de avaliação da função plaquetária	39
1.4- Plaquetas Reticuladas	39
1.5- Síndromes Falciformes	43
1.6- Trombogênese na Doença Falciforme	44
1.7- Tratamento da Doença Falciforme	45
1.8- Plaquetas Reticuladas nas SF	45
2- OBJETIVOS	47
3- CASUÍSTICA	51
4- MÉTODOS	55
4.1- Determinação dos valores de PLT, P-LCR, Leucócitos	57
4.2- Separação e preparo das Plaquetas	58
4.3- Marcadores Celulares	59
4.4- Quantificação das Plaquetas Ativadas e PRs	59
4.5- Dosagem dos níveis séricos de P-selectina solúvel, TPO, IL-3 e IL-6	64
4.6- Análise Estatística	65

5- RESULTADOS.....	67
6- DISCUSSÃO.....	79
7- CONCLUSÕES.....	87
8- ARTIGO.....	91
9- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	121
10- ANEXOS.....	133
11- APÊNDICES.....	139

ADP	adenosina difosfato
CD41a-PECy5	anticorpo monoclonal anti-complexo GP IIb/IIIa+fluorocromo “Cycrome”
CD62p	anticorpo monoclonal anti- P-selectina
CD62p⁺ (#)	número absoluto de plaquetas ativadas
CD62p-PE	anticorpo monoconal anti-P-selectina+fluorocromo ficoeritrina
Células CD34⁺	células progenitoras hematopoiéticas
CFU-E	unidades formadoras de colônia de eritrócitos
CFU-GEMM	unidades formadoras de colônias de granulócitos-eritrócitos-macrófagos e megacariócitos
CH	crise hemolítica
CPP	transplante de células progenitoras do sangue periférico
CSF-GM	fator estimulante de colônias de granulócitos e monócitos
CVO	crise vaso-oclusiva
DC	corrente elétrica direta
EPO	Eritropoietina
F	feminino
FSC	dispersão frontal do laser
GC	grupo controle
GP	glicoproteína
HbF	hemoglobina fetal
HbSβ	S β talassemia

HbS	hemoglobina S
HbSC	hemoglobinopatia SC
HbSS	anemia falciforme
HU	hidroxuréia
IFN	interferon
IL	interleucina
IMF-CD62p⁺ (PRs)	índice médio de fluorescência das
IMF	índice médio de fluorescência
IRF	fração de imaturidade dos reticulócitos
M	masculino
Max	máximo
meg-CFC	célula formadora de colônia megacariocítica
Min.	mínimo
Mix-CFU	unidades formadoras de colônias de granulócitos-eritrócitos-macrófagos e megacariócitos
MoAb	anticorpo monoclonal
MPPs	micropartículas de plaquetas
PDW	distribuição da população de plaquetas de acordo com o volume
PECy5	“Cychrome”
PF4	fator 4 de plaquetas
	plaquetas ativadas e reticuladas
P-LCR (#)	número absoluto de macroplaquetas
P-LCR (%)	porcentagem de macroplaquetas

PLT	contagem total de plaquetas
	positivas ou plaquetas reticuladas e ativadas
PRP	plasma rico em plaquetas
PRs (#)	número absoluto de plaquetas reticuladas
PRs (%)	porcentagem de plaquetas reticuladas
PRs	plaquetas reticuladas
PTI	púrpura trombocitopênica idiopática
RNA	ácido ribonucléico
RPE	ficoeritrina
sCD62p	P-selectina solúvel
SCF	fator estimulante de células tronco
SF	Síndromes Falciformes
SSC	dispersão lateral do laser
TE	trombocitemia essencial
TMO	transplante de medula óssea
TNF	fator de necrose tumoral
TO	<i>thiazole orange</i>
TO⁺	células <i>thiazole orange</i> positivas
TO⁺/CD62p⁺	células <i>thiazole orange</i> e P-selectina
TPO	Trombopoietina
TR	trombocitose relativa
TSP	Trombospondina
VCAM	molécula de adesão célula-vaso

LISTA DE TABELAS

	<i>Pág.</i>
Tabela 1 Características clínicas dos pacientes.....	54
Tabela 2 Análise descritiva dos parâmetros estudados.....	70
Tabela 3 Parâmetros plaquetários: comparação entre os grupos de pacientes e controle.....	71
Tabela 4 Correlações entre parâmetros referentes às plaquetas, dosagens de ILs e TPO em pacientes com SF.....	77
Tabela 5 Comparação entre os grupos referentes às dosagens dos valores das ILs, TPO, contagem de leucócitos.....	78

	<i>Pág.</i>
Figura 1 Histograma de distribuição das plaquetas para a determinação do parâmetro P-LCR pelo analisador Sysmex XE-2100.....	58
Figura 2 Citograma de separação das plaquetas por método óptico.....	60
Figura 3 Citograma de separação das plaquetas marcadas com anticorpo monoclonal específico.....	61
Figura 4 Citograma de identificação e quantificação das PLT ativadas.....	62
Figura 5 Citograma de identificação e quantificação das PRs.....	63
Figura 6 Citograma de identificação e quantificação das PRs ativadas.....	64
Figura 7 “Boxplots” das contagens absolutas de macroplaquetas nas fases “estável” e CVO dos pacientes com SF.....	72
Figura 8 “Boxplots” das contagens absolutas de plaquetas ativadas nos grupos de pacientes com HbSS e HbSC em CVO.....	74
Figura 9 “Boxplots” dos valores de a intensidade de ativação das PRs nos grupos de pacientes com HbSS, HbSC e HbS β na fase “estável”.....	75
Figura 10 “Boxplots” mostrando em todos grupos a diferença de intensidade de ativação entre as PRs e as plaquetas maduras.....	76

RESUMO

Introdução: Plaquetas reticuladas (PRs) são plaquetas jovens recentemente liberadas pela medula óssea para a circulação e que possuem alto conteúdo de RNA em seu citoplasma. As PRs são descritas como plaquetas grandes, densas e mais ativas no processo de formação do trombo hemostático. A participação das plaquetas ativadas nos fenômenos vaso-oclusivos que acometem pacientes com síndrome falciformes (SF) já está documentada, mas a avaliação do papel das PRs não foi ainda descrito. Assim, avaliamos o número e a atividade das PRs, correlacionando-os com os níveis séricos de P-selectina solúvel (sCD62p), interleucina-6 (IL-6), interleucina-3 (IL-3) e trombopoietina (TPO) em sangue periférico de pacientes em diferentes estágios clínicos das SF.

Casuística e Métodos: Foram estudados 89 pacientes adultos, sendo 38 em fase “estável”, 27 em crise hemolítica (CH), 27 em crise vaso-oclusiva (CVO) e 30 indivíduos saudáveis (grupo controle - GC). Os parâmetros plaquetários, incluindo a quantificação de macroplaquetas foram determinados em analisador hematológico. Através da técnica da citometria de fluxo com o uso de anticorpos monoclonais e *thiazole orange* (TO), realizamos as identificações e quantificações das plaquetas ativadas (anti CD41a + anti CD62p), PRs (anti CD41a + TO) PRs ativadas (TO + anti CD62p). As dosagens de sCD62p, IL-6, IL-3 e TPO foram realizadas pela técnica de ELISA.

Resultados: O número de macroplaquetas foi significativamente superior nas 3 fases clínicas das SF em relação ao GC. O número de plaquetas ativadas, tanto reticuladas como maduras foi superior em todas as fases clínicas quando comparadas ao GC. Os valores de PRs mostraram-se mais elevados no grupo de pacientes em CVO do que na fase “estável” e na CH. Em todos os grupos as PRs apresentaram um maior grau de ativação quando comparadas às plaquetas maduras. Os pacientes em CVO apresentaram maiores níveis de sCD62p em relação ao GC. Nas diferentes fases das SF observamos níveis séricos elevados de IL-6, IL-3 e TPO, embora não tenha sido observada correlação entre essas determinações com os números absolutos de PRs, Plaquetas ativadas (CD62p⁺) e PRs ativadas (TO⁺/CD62p⁺).

Conclusões: Os resultados sugerem a contribuição das PRs na trombogênese das Síndromes Falciformes. Níveis elevados das interleucinas provavelmente indicam a participação das mesmas no processo inflamatório que acompanha os fenômenos de vaso-oclusão, mas aparentemente esses moduladores inflamatórios não exercem efeito sobre a trombopoiese em pacientes com SF.

ABSTRACT

Introduction: Reticulated Platelets (RPs) are youngest platelets released recently from bone marrow to the blood and are characterized by the high cytoplasmatic RNA content. RPs are described as higher size, denser and more active in the formation of thrombus than mature platelets. The participation of activated platelets in vaso-occlusive process in sickle cell disease patients have been documented, but the evaluation of the RPs role has not been established at the moment. We evaluated the number and activity of RPs and correlated them with serum soluble P-selectin (sCD62p), Interleukin-6 (IL-6), Interleukin 3 (IL-3) and thrombopoetin (TPO) levels in patients with sickle cell diseases in different clinical expressions. **Casuistic and Methods:** Eighty-nine adult patients were studied: 38 in steady-state, 27 in hemolytic crisis (HC), 27 in vascular-occlusive crisis (CVO) and 30 healthy individuals (control group–CG). Platelet parameters including the percentage of larger platelets were obtained by an automatic hematological analyzer. Monoclonal antibodies, *thiazole orange* (TO) dye and flow cytometric technique were used to identify and to quantify activated platelets (anti CD41a+ and anti CD62p+), RPs (anti CD41a+ and TO+) and activated RPs (TO+ and anti CD62p+). Soluble CD62p, IL-3, IL-6 and TPO determinations were measured by ELISA tests.

Results: The number of macroplatelets was significantly higher in steady-state, CVO and HC groups than in CG. The number of activated mature platelets and activated RPs was higher in all stages of the disease when compared with CG. PRs values were more elevated in group of patients with CVO than in HC and steady-state. The degree of activation was higher in PRs than in mature platelets independently on sickle cell disease phase. CVO patients showed higher serum levels of sCD62p than CG. IL-6, IL-3 and TPO serum levels were increased in sickle cell disease, but there was not a correlation between those determinations and parameters related to platelets.

Conclusions: Our results suggest that PRs contribute to the thrombogenesis process in sickle cell disease. Increased serum levels of interleukins probably indicate the participation of PRs in inflammatory process which is associated to vascular-occlusive phenomenon, but apparently those inflammatory mediators do not have an effect on thrombopoiesis in sickle cell disease patients.

1- INTRODUÇÃO

1.1- Trombopoiese

A trombopoiese ou megacariocitopoiese é o processo de proliferação e diferenciação dos megacariócitos, células responsáveis pela produção das plaquetas (Wendling, 1999). O fato das plaquetas derivarem dos megacariócitos, é conhecido desde 1906, mas o processo de produção das mesmas ainda não está de todo elucidado. Os megacariócitos são células grandes e poliplóides presentes em pequeno número na medula óssea (Kuter, 2001). O megacarioblasto, precursor do megacariócito, é originário do processo de diferenciação da *stem cell* hematopoiética. A maneira pela qual a célula tronco se diferencia em megacariócito foi esclarecida através dos estudos com cultura de células *in vitro*, onde se verificou a capacidade das células produzirem colônias de células de várias linhagens, como unidades formadoras de colônias de granulócitos-eritrócitos-macrófagos-megacariócitos (CFU-GEMM ou Mix-CFC) e progenitores mais tardios comprometidos somente com a diferenciação em megacariócitos (meg-CFC) (Nakahata e Ogawa, 1982).

Durante o processo de maturação, o núcleo do megacariócito replica por endomitose, enquanto o citoplasma aumenta de volume, até que se torna granular e as plaquetas são liberadas (Hoffbrand e Petit, 1993).

O mecanismo pelo qual as plaquetas são liberadas na circulação ainda é obscuro. Cada megacariócito produz, em média, 1000 a 3000 plaquetas e tem sido estimado que 35000 a 45000 plaquetas são produzidas por μl de sangue por dia (Ballem et al., 1992). Nos períodos de grande demanda, a produção normal de plaquetas pode aumentar em até seis vezes (Harker e Finch, 1969).

São propostos 3 mecanismos para a formação das plaquetas a partir dos megacariócitos: o primeiro seria por fragmentação citoplasmática do megacariócito e liberação desses fragmentos através dos sinusóides da medula. O segundo seria pela formação de pró-plaquetas (pedaços de citoplasma de megacariocíticos maiores do que as plaquetas) lançados na circulação e, terceiro pela fragmentação dos megacariócitos lançados na circulação pulmonar (Trowbridge, 1982).

Em 1958, foi sugerido que a produção das plaquetas era regulada por um fator de crescimento humoral, chamado de trombopoietina (TPO) (Wedling, 1999). A TPO humana é produzida no fígado pelas células do parênquima, e uma pequena parte no rim (Nomura et al., 1997). Trata-se de uma glicoproteína de 332 aminoácidos e peso de 80-90 KDa, que é liberada na circulação, sem armazenamento intracelular no fígado ou rim (Kuter, 2001).

In vitro, a ação da TPO em células CD34⁺ (células progenitoras) que expressam receptores de TPO - c-Mpl na sua superfície resulta na transformação destas células em megacariócitos e posterior liberação de plaquetas (Choi et al., 1995). Embora a TPO estimule células progenitoras jovens de todas as linhagens e células tronco pluripotentes, o estímulo de maturação ocorre somente nos megacariócitos (Kaushansky et al., 1996). Quando administrada em animais normais, a TPO estimula o aumento de células precursoras de megacariócitos (meg-CFC) na medula óssea e sangue periférico, aumenta o número de megacariócitos na medula óssea e eleva a contagem de plaquetas no sangue periférico (Basser et al., 1996).

O estágio final da liberação das plaquetas não depende da TPO e pode ser inibido por grandes quantidades da mesma (Choi et al., 1995). Citocinas como a interleucina-3 (IL-3), IL6 e IL-11, promovem o crescimento de meg-CFC e maturação de megacariócitos, e são capazes de aumentar toda produção de plaquetas *in vivo*, mas tem pouco efeito sobre a endomitose (Stahl et al., 1992; Carlino et al., 1992). A IL-3 e o fator estimulante de colônia de granulócitos e macrófagos (CSF-GM), quando usados em sistemas de cultura, são potentes estimuladores da proliferação das meg-CFC, mas possuem pouco efeito sobre sua maturação. Ao contrário, a IL-6 e IL-11 (membros da mesma família), não têm efeito sobre a proliferação das meg-CFC, mas potencializam a ação da IL-3 e CSF-GM por agirem predominantemente sobre a maturação dos megacariócitos (Wedling e Han, 1997). A utilização da IL-3 e IL-6 para estimular a produção de plaquetas mostrou ser tóxica em estudos clínicos, enquanto a IL-11, por mostrar modestos efeitos colaterais, foi aprovada pelo FDA para ser usada na prevenção de trombocitopenia induzida por quimioterapia (Kaye, 1998), e demonstrou reduzir em 27% a necessidade de transfusões de plaquetas (Tepler et al., 1996).

A utilização da forma recombinante humana da IL-11, estimula o crescimento de megacariócitos e aumenta a produção de plaquetas, similarmente à ação da TPO. Este estímulo não é mediado pela elevação ou sinergismo da TPO e independe do receptor deste hormônio (c-Mpl) (Wendling e Vainchenker, 1995). Enquanto algumas citocinas aumentam a produção de plaquetas, existem alguns fatores inibitórios, como os Interferon alfa (INF- α) e beta (INF- β) que agem inibindo o crescimento da meg-CFC (Bellucci et al., 1996). Em pacientes com hepatite crônica, o INF- α provoca uma queda rápida na contagem de plaquetas (Shiota et al., 1997) e o mesmo tem sido usado clinicamente para reduzir o número de plaquetas em pacientes com trombocitemia e outras desordens mieloproliferativas (Gisslinger et al., 1997). Ao contrário dos dois tipos de IFN, acima descritos, o IFN- γ age estimulando o crescimento da meg-CFC (Muraoka et al., 1997).

Uma outra proteína, denominada trombospondina (TSP), também está envolvida com a maturação dos megacariócitos. Está presente nos grânulos α das plaquetas e na matriz extracelular do subendotélio. É rapidamente liberada por estímulo da trombina (Long e Dixit, 1990). A TSP pode interagir com receptores das células hematopoiéticas e não-hematopoiéticas, como a proteína CLA-1, o receptor CD36, expresso durante a maturação de eritrócitos (no estágio da unidade formadora de colônia eritróide - CFU-E) e megacariócitos (Doraby et al., 1997). Funciona também como agonista no estímulo da agregação plaquetária mediada pela glicoproteína (GP) IIb/IIIa (Sixma, 1994).

1.2- Plaquetas

As plaquetas são células maduras anucleadas, que tem a capacidade de se aderirem aos vasos sanguíneos danificados, agregarem-se umas às outras, facilitando, assim, a geração de trombina (Delgado et al., 2003; Parise et al., 2001). Estas ações contribuem com a hemostasia através da formação do tampão de plaquetas, e este tampão é reforçado pela ação da trombina na conversão do fibrinogênio em fios de fibrina. Para realizar suas funções, as plaquetas possuem receptores de superfície, que são GP, que reagem com moléculas de adesão, inibidores e fatores da coagulação. Entre essas GP

temos: o complexo GPIb/IX/V que apóia a adesão das plaquetas pela ligação com multímeros do fator de von Willebrand; e o receptor GPIIb/IIIa que é específico das plaquetas e mediador da agregação plaquetária, predominantemente pela ligação com o fibrinogênio. Os receptores GPIa/IIa ($\alpha 2\beta 1$), GPVI, GPIc*/IIa ($\alpha 5\beta 1$) para fibronectina e o GPIc/IIa ($\alpha 6\beta 1$) para laminina, também contribuem com a adesão das plaquetas. Além destes, as plaquetas ativadas expressam em sua superfície a P-selectina (CD62p), que é mediadora da interação com os leucócitos (Parise et al., 2001; Sixma, 1994).

Quando as plaquetas estão ativadas, há uma mudança na forma da célula, devido uma complexa alteração do citoesqueleto: tornam-se mais esféricas e lançam pseudópodes que aumentam a interação entre as plaquetas adjacentes. A exposição do colágeno ou a ação da trombina resultam na liberação do conteúdo plaquetário dos grânulos- α , dos corpos densos e dos lisossomas, que inclui: adenosina difosfato (ADP), serotonina, fibrinogênio, enzimas lisossomais, β tromboglobulina, heparina e P-selectina (Parise et al., 2001). A P-selectina tem peso molecular de 140.000 KDa (Hsu-Lin et al., 1984) e é composta por um domínio de lectina, e um domínio do fator de crescimento epidermal, seguido de 9 domínios repetidos análogos às proteínas reguladoras do complemento, uma região transmembrana e um domínio citoplasmático (Johnston et al., 1989). Está presente na membrana dos grânulos α de plaquetas em repouso e se expressa na membrana plasmática quando a plaqueta é ativada. A sua expressão é usada como um marcador da ativação plaquetária *in vivo* (Abrams e Shattil, 1991). A P-selectina pode mediar a interação dos neutrófilos e monócitos às plaquetas e células endoteliais, através do reconhecimento do ligante 1 da P-selectina presente na superfície dos neutrófilos e monócitos (Yeo et al., 1994).

O processo de ativação envolve a participação de agonistas com seus receptores, como: ADP, epinefrina, trombina, colágeno, tromboxana A_2 e fator de ativação de plaquetas. Também o aumento do cálcio intracelular é considerado um mediador da ativação das plaquetas. A mudança de conformação da GPIIb/IIIa e a liberação de ADP e tromboxane A_2 promovem a agregação plaquetária. A exposição do fator plaquetário 3 media a formação do fator Xa, agindo com os fatores IXa, VIII e X e media a formação da trombina, através da interação com os fatores Xa, V e II. Forma-se, então a rolha homeostática (Parise et al., 2001).

1.3- Método de avaliação da função plaquetária

A citometria de fluxo é um importante método usado na avaliação das características específicas de diferentes tipos celulares. Para a análise por citometria de fluxo, as células em suspensão são marcadas com anticorpos monoclonais (MoAb) anti-proteínas e outros elementos expressos na membrana citoplasmática ou presentes no meio intracelular. A identificação das células marcadas é possível devido ao uso de MoAb conjugado com diferentes fluorocromos, por exemplo: ficoeritrina, isotiocianato, cicromo e outros. Após a marcação, as células suspensas são analisadas no Citômetro de Fluxo através de um canal que permite o fluxo de 1000 a 10000 células por minuto, sob emissão de um *laser* (Michelson, 1996). De acordo com o tipo de fluorocromo, muda-se o comprimento de onda do *laser* para gerar a emissão de fluorescência, que será processada por um detector de sinais. A associação da fluorescência e dispersão de luz processada pelo detector permite a identificação das propriedades de cada célula analisada (Givan, 1992).

Atualmente, a citometria de fluxo é uma das técnicas utilizada na avaliação das funções plaquetárias, como na investigação da hiperatividade e/ou ativação das plaquetas no sangue periférico em diferentes patologias, incluindo angina *pectoris*, infarto do miocárdio, acidente vascular cerebral, diabetes *mellitus*, doença vascular periférica e pré-eclampsia (Michelson, 1996). Entretanto, trata-se de uma técnica de alto custo que requer profissionais habilitados para o preparo pré-analítico e análise dos resultados (Shattil et al., 1987).

1.4- Plaquetas reticuladas

As Plaquetas Reticuladas (PRs) representam plaquetas jovens recentemente liberadas pela medula óssea, e são caracterizadas pelo alto conteúdo de ácido ribonucléico (RNA) em seu citoplasma (Semple et al., 1997; Dale et al., 1995; Ault et al., 1992). Ingraham e Coopersmith (1969), em estudos com cães, utilizaram o corante *New Methylene Blue* e a microscopia óptica para estimar o número de PRs. Sugeriram que estas células

continham quantidades aumentadas de RNA citoplasmático e eram análogas aos reticulócitos da série eritrocítica, podendo refletir o grau de atividade trombopoética da medula óssea. Com o processo de maturação, as plaquetas diminuem de tamanho, há uma redução do conteúdo de RNA e, conseqüentemente, uma redução na síntese de proteínas (Karpatkin, 1972)

A porcentagem de PRs na circulação pode ser determinada pelo uso do corante (fluorocromo) *thiazole orange* (TO), que mede o conteúdo individual de ácido nucléico das plaquetas através da análise por citometria de fluxo (Ault et al., 1992). O TO entra nas células vivas, exibindo um grande aumento na emissão de fluorescência ao ligar-se com o RNA e DNA, semelhantemente ao que ocorre com os reticulócitos da série eritrocítica (Lee et al., 1986). A marcação das PRs com TO é parcialmente abolida pelo tratamento com RNAase, o que reforça o conceito do alto conteúdo de mRNA nas PRs. O material RNAase resistente provavelmente corresponde a RNA ribossomal ou outros componentes plaquetários (Ault et al., 1992).

1.4.1- Aplicações

A quantificação das PRs tem sido realizada em diversas patologias. A atividade trombopoética foi estudada em pacientes com diagnóstico de hipertireoidismo e mostrou níveis mais elevados de PRs no hipertireoidismo do que na fase de eutireoidismo, embora a contagem de plaquetas fosse similar nas duas fases (Stiegler et al., 1998). Tal fato pode ser explicado pelo o aumento da produção de plaquetas, conseqüente à redução do período de vida destas células, provavelmente devido à presença de anticorpos anti-plaquetas responsáveis pela destruição das mesmas (Panzer et al., 1990).

A quantificação das PRs pode ser usada para diferenciar a trombocitemia essencial (TE) da trombocitose reativa (TR) (Harrison et al., 1998). Na TE a porcentagem de PRs está significativamente elevada quando comparada com a TR, enquanto o número absoluto de plaquetas é idêntico em ambos (Robinson et al., 1998). Isto sugere que a produção global de plaquetas e o “turnover” estão elevados na TE (Robinson et al., 1998), em resposta ao elevado nível de TPO descrito nesta patologia (Cerutti et al., 1997; Tahara et al., 1996).

Outro estudo com 20 indivíduos com púrpura trombocitopênia idiopática (PTI) crônica mostrou um aumento na contagem de plaquetas e uma alta porcentagem de PRs no sangue circulante (Watanabe et al., 1995). Rinder et al. (1993) observaram que 17% dos pacientes com PTI aguda estudados tiveram uma porcentagem relativamente reduzida de PRs, sugerindo uma baixa atividade trombopoietica. Como na PTI as PRs estão sujeitas à destruição periférica na mesma proporção que as plaquetas maduras (Ault et al., 1992), a porcentagem das PRs pode permanecer inalterada, embora a contagem absoluta esteja reduzida devido à rápida destruição. Assim, o valor das PRs em porcentagem pode ser usado como uma alternativa na avaliação da trombopoiese em certos tipos de trombocitopenias onde a contagem absoluta não está elevada, devido ao aumento da destruição das plaquetas (Watanabe et al., 1995).

Watanabe et al. (1995) estimaram o número de PRs em diferentes hemopatias. Pacientes com leucemia mielóide aguda, anemia aplástica e trombocitopenia induzida por quimioterapia, apresentaram contagens absolutas de PRs significativamente diminuídas, o que é compatível com a redução da trombopoiese nessas situações. Os valores percentuais, entretanto, nem sempre acompanharam as quantificações em números absolutos, o que pode representar uma anormalidade qualitativa da trombopoiese. Os mesmos autores acompanharam 2 pacientes com leucemia. O primeiro deles foi submetido à quimioterapia e apresentou uma elevação na porcentagem de PRs 2 a 3 dias antes do aumento da contagem de plaquetas. O segundo paciente foi submetido a transplante de medula e a elevação da porcentagem de PRs precedeu a elevação das contagens de plaquetas em 4 a 5 dias. Os autores sugerem, então, que a quantificação de PRs pode ser usada como preditor da recuperação da trombopoiese em pacientes com medula óssea hipoplástica.

Pacientes com trombocitose associada a doenças mieloproliferativas, podem ter hemorragia e complicações trombóticas que estão relacionadas à função anormal das plaquetas, ao aumento de plaquetas circulantes ou ambos (Landolfi et al., 1992). Rinder et al., 1996, avaliaram as PRs em um grupo de pacientes com trombocitose e observaram maior porcentagem de PR nos indivíduos com trombose do que nos que não apresentaram episódios trombóticos. Isso pode indicar um maior *turnover* das plaquetas

devido à perda das plaquetas em coágulos arteriais ou arteriolares (Rinder et al., 1996). Uma segunda possibilidade seria que o aumento das PRs refletiria uma alteração fisiológica das plaquetas, com maior adesão ao endotélio, leucócitos ou outras plaquetas. Esses coágulos seriam removidos da circulação, aumentando o *turnover* plaquetário (Rinder et al., 1992).

Após o transplante de medula óssea (TMO) e o transplante de células progenitoras do sangue periférico (CPP), há um quadro de pancitopenia profunda e transitória. Ocorre uma queda na contagem de PRs paralelamente à contagem de plaquetas; entretanto, a contagem de PRs aumenta antes do que a contagem de plaquetas, tanto no transplante de CPP (média=2,5 dias) como no de TMO (média=14 dias) (Richards et al., 1996). O aumento das PRs precede a recuperação de neutrófilos em ambos tipos de transplantes, o que sugere que este aumento pode ser um indicador precoce da recuperação medular pós-transplante (Saxon et al., 1998)

Após o transplante de fígado, é freqüente a trombocitopenia (McCaughan et al., 1992). Esta trombocitopenia pode ocorrer devido à redução na produção de plaquetas, aumento no consumo, sequestro das plaquetas, hemodiluição ou a combinação destes processos. Acompanhando a evolução de 45 pacientes submetidos à transplante de fígado foi observada uma elevação na porcentagem de PRs, o que sugere um aumento compensatório da trombopoiese conseqüente ao aumento do consumo das plaquetas e a maior produção de TPO pelo fígado transplantado. A maior geração de trombina nos primeiros dias, seguida da maior geração de plasmina, reforça a idéia de que as plaquetas teriam sido consumidas na formação de trombos, durante o procedimento cirúrgico (McCaughan et al., 1992).

Pacientes com doença renal grave submetidos à diálise apresentam alterações funcionais das plaquetas, como uma hiperatividade plaquetária devido à interação das plaquetas com as membranas de diálise ou com o próprio endotélio vascular (Windus et al., 1995). Durante o processo de hemodiálise também foi observada a exposição da P-selectina (Reverter et al., 1994). Com isso, as plaquetas ativadas podem ser retidas no filtro de hemodiálise, seqüestradas pelo baço ou aderir aos neutrófilos e monócitos através da exposição da P-selectina (McEver, 1991).

Um aumento de 2 a 3 vezes o número das PRs nos pacientes submetidos à diálise e independente do número de plaquetas, sugere que a atividade repetitiva das plaquetas leva à elevação do *turnover* das plaquetas. Além disso, a uremia por si só pode ser responsável pelo maior consumo e reposição das plaquetas (Himmerfarb et al., 1997).

A avaliação das PRs tem sido estudada em outras condições que envolvem o consumo de plaquetas. Valores elevados foram observados precocemente na hipertensão induzida pela gravidez (Rinder et al., 1994), na síndrome urêmica hemolítica, na púrpura trombocitopênica trombótica, no hiperesplenismo e na coagulação intravascular disseminada (Rinder et al., 1993). Semple et al. (1997), utilizaram a quantificação das PRs para ajudar a delinear o mecanismo da trombocitopenia na síndrome de Wiskott-Aldrich. Além disso, a contagem de PR pode ser utilizada em problemas clínicos complexos, onde a etiologia da trombocitopenia é multifatorial e as contribuições da supressão medular e consumo de plaquetas são freqüentemente difíceis de determinar (Saxon et al., 1998).

1.5- Síndromes falciformes (SF)

A hemoglobina S (HbS) é uma proteína mutante proveniente da substituição do ácido glutâmico pela valina na posição 6 da cadeia β da globina. Quando há baixa tensão de oxigênio a molécula da HbS torna-se polimerizada e pouco solúvel, deformando os eritrócitos (Beutler, 2001). As Síndromes Falciformes (SF) ocorrem quando o indivíduo é homocigoto para a mutação (SS) ou duplo heterocigoto devido à associação da HbS com outras hemoglobinopatias, como a β -talassemia (HbS β) e hemoglobinopatia C (HbSC) (Beutler, 2001).

A HbS ocorre com maior prevalência na população africana, onde a freqüência dos heterocigotos pode chegar a 40%, dependendo da região. Entre os negros americanos, a freqüência do traço falciforme é de cerca de 7,8% (Beutler, 2001).

No Brasil, a distribuição das alterações hereditárias da hemoglobina é heterogênea. Há uma estimativa de que 5.0% a 6.0% da população brasileira possui o gene da HbS e, 700 a 1.000 novos casos são diagnosticados por ano (Lyra et al., 2005).

Os pacientes com a doença falciforme intercalam períodos de estado clínico estável com períodos de crises, que podem ter um começo súbito e ocasionalmente com resultado fatal. As crises são classificadas como: crise vaso-oclusiva (CVO), crise de sequestramento esplênico, crise hemolítica (CH) e crise aplástica. As complicações clínicas decorrentes da doença ocorrem com frequência durante a vida dos pacientes. As principais são: infarto esplênico, acidentes vasculares, infarto ósseo com necrose da cabeça do fêmur, úlceras nos membros inferiores, hipertensão pulmonar e falência renal (Beutler, 2001).

1.6- Trombogênese nas SF

A CVO é a complicação clínica mais comum nos pacientes com SF é caracterizada por episódios agudos de dor. A polimerização da hemoglobina não é o único fator responsável pela vaso-oclusão, mas também o aumento da tendência de adesão das células falciformes ao endotélio vascular (Hebbel et al., 1997; Embury et al., 1994). Com a aderência das células o fluxo de sangue fica impedido, o que aumenta o tempo de trânsito capilar, causando o início e a propagação do processo vaso-oclusivo.

A retenção de eritrócitos falcizados rígidos nos vasos sanguíneos resulta em dano endovascular, com subsequente geração de trombina que, por sua vez, leva à oclusão vascular trombótica (Francis e Johnson, 1991). Vários mecanismos de adesão entre as células endoteliais e hemácias estão envolvidos no processo de vaso-oclusão. Algumas condições favorecem a expressão de receptores de adesão pelas células endoteliais, como: hipóxia, presença de trombina, fator de necrose celular, fator ativador de plaqueta e IL-1 (Hebbel et al., 2004; Hebbel et al., 1980; Hebbel, 2000). Nas células vermelhas estão expressos os receptores de adesão CD36, que se ligam à trombospondina e à integrina $\alpha_L\beta_2$, que se liga tanto a fibronectina como à molécula de adesão célula-vascular 1 (VCAM-1). Nas células endoteliais os receptores incluem CD36, integrina $\alpha_v\beta_3$, o complexo de GP Ib, IX, e V que se liga ao fator de von Willebrand e VCAM-1 (Hebbel, 2000). Nos locais onde ocorrem os danos vasculares, as plaquetas contribuem para a trombogênese inicialmente através de sua fixação e, subsequentemente, pela sua ativação, mediada por três vias independentes: geração de tromboxana A_2 , secreção de ADP dos

grânulos densos e clivagem dos receptores da trombina nas plaquetas pela trombina (Harker et al., 1997; Colman et al., 1994).

Tomer et al. (2001), estudaram pacientes com anemia falciforme (HbSS) e compararam vários parâmetros relacionados à atividade trombogênica durante períodos com e sem dor. Observaram que os pacientes apresentaram evidências de ativação plaquetária, geração de trombina e fibrinólise superiores ao grupo controle normal mesmo quando estavam assintomáticos e que essas alterações eram exacerbadas durante os episódios dolorosos. A expressão da P-selectina foi 7 vezes maior nos períodos com dor do que nos períodos sem dor e, nesses, maior do que nos indivíduos normais.

1.7- Tratamento das SF

Uma das drogas utilizadas no tratamento dos pacientes com SF é a hidroxiureia (HU), que estimula a produção de hemoglobina fetal (HbF) e diminui as crises de falcização (Dover e Charache, 1992). É uma droga citotóxica que interfere na síntese de DNA e, conseqüentemente, na modulação dos fatores transcricionais, agindo diretamente nos progenitores eritróides, reprogramando-os a produzir HbF (Dover e Charache, 1992). Além do efeito sobre a síntese de HbF a HU reduz o número de reticulócitos, inclusive reticulócitos mais imaturos que expressam ligantes que facilitam a adesão das células ao endotélio durante o processo de vaso-oclusão (Steinberg et al., 1997).

A HU é usada como um agente mielossupressivo, altamente efetivo no início da terapia de TE. Assim como nas outras patologias, o uso da HU no tratamento da HbSS pode causar trombocitopenia.

1.8- Plaquetas reticuladas nas SF

Apesar de definido o comportamento das PRs em diversas patologias, sua participação na trombogênese das SF ainda não foi descrita. Sabe-se que as plaquetas maduras nas SF contribuem para instalação e manutenção da CVO através da sua fixação

no local do dano endovascular. A fixação é seguida do processo de ativação, descrito como exacerbado durante os episódios de dor (Tomer et al.,2001; Harker et al., 1997; Colman et al., 1994) .

Com isso, consideramos importante a avaliação das PRs nas SF, seu grau de ativação e possíveis influências de citocinas sobre a quantificação ou atividade das plaquetas jovens circulantes nos diferentes períodos das SF.

2- OBJETIVOS

- Avaliar o comportamento das PRs no período “estável” e nos períodos de crise (CH e CVO) em pacientes com SF.
- Avaliar o grau de ativação das PRs comparando-as às plaquetas maduras.
- Correlacionando o número de PRs no sangue periférico dos pacientes com SF com os níveis séricos das citocinas pró-inflamatórias IL-6 e IL-3, e da TPO, verificar a possível influência desses mediadores no comportamento das PRs.
- Determinar os níveis séricos de sCD62P nas diferentes fases das SF e correlacioná-los com os números de PRs, plaquetas ativadas e PRs ativadas.

3- CASUÍSTICA

Foram estudados 89 pacientes com as seguintes SF: HbSS (n=54), HbSC (n=19) e S β talassemia (n=16) atendidos no período de março de 2004 à outubro de 2005, no ambulatório de hemoglobinopatias do Centro de Hematologia e Hemoterapia (HEMOCENTRO) da UNICAMP e pelo Pronto Socorro do Hospital das Clínicas (HC/UNICAMP). De acordo com as recomendações do Comitê de Ética e Pesquisa (Parecer N^o: 478/2002) da Faculdade de Ciências Médicas (FCM/UNICAMP) todos os pacientes foram previamente esclarecidos a respeito do estudo e, se de acordo, foram submetidos à coleta do sangue após assinatura do termo de consentimento. Os pacientes foram divididos em três grupos de acordo com o estado clínico no momento da coleta de sangue em: fase “estável”, CH e CVO (Tabela 1).

O grupo controle (GC) foi composto por 30 indivíduos saudáveis, sendo 11 homens e 19 mulheres com mediana de idade semelhante à dos pacientes (33 anos (min. = 21; máx. = 50)). Todos os indivíduos que participaram como voluntários são funcionários ou alunos do Laboratório de Patologia Clínica (HC/UNICAMP) e/ou Departamento de Patologia Clínica (FCM/UNICAMP), que foram previamente esclarecidos sobre o projeto.

Deste estudo foram excluídos os pacientes com diagnóstico de infecção, insuficiência renal, síndrome torácica aguda, histórico de acidente vascular e, os transfundidos durante os 20 dias que antecederam a abordagem.

Tabela 1- Características clínicas dos pacientes (n = 89).

Fases da doença	Sexo (M – F)	Idade (anos) mediana (mín. – máx.)	Diagnósticos n - (%)	Em tratamento (HU)
fase “estável” (n=38)	11 - 27	31.5 (19-52)	HbSS = 11 - (29) HbSC= 14 - (37) HbSβ = 13 - (34)	12
CH (n=27)	16 - 11	32.0 (16-54)	HbSS = 24 - (89) HbSC= 01 - (4) HbSβ = 02 - (7)	04
CVO (n=24)	12 - 12	28.0 (16-45)	HbSS = 19 - (79) HbSC= 04 - (17) HbSβ = 01 - (4)	03

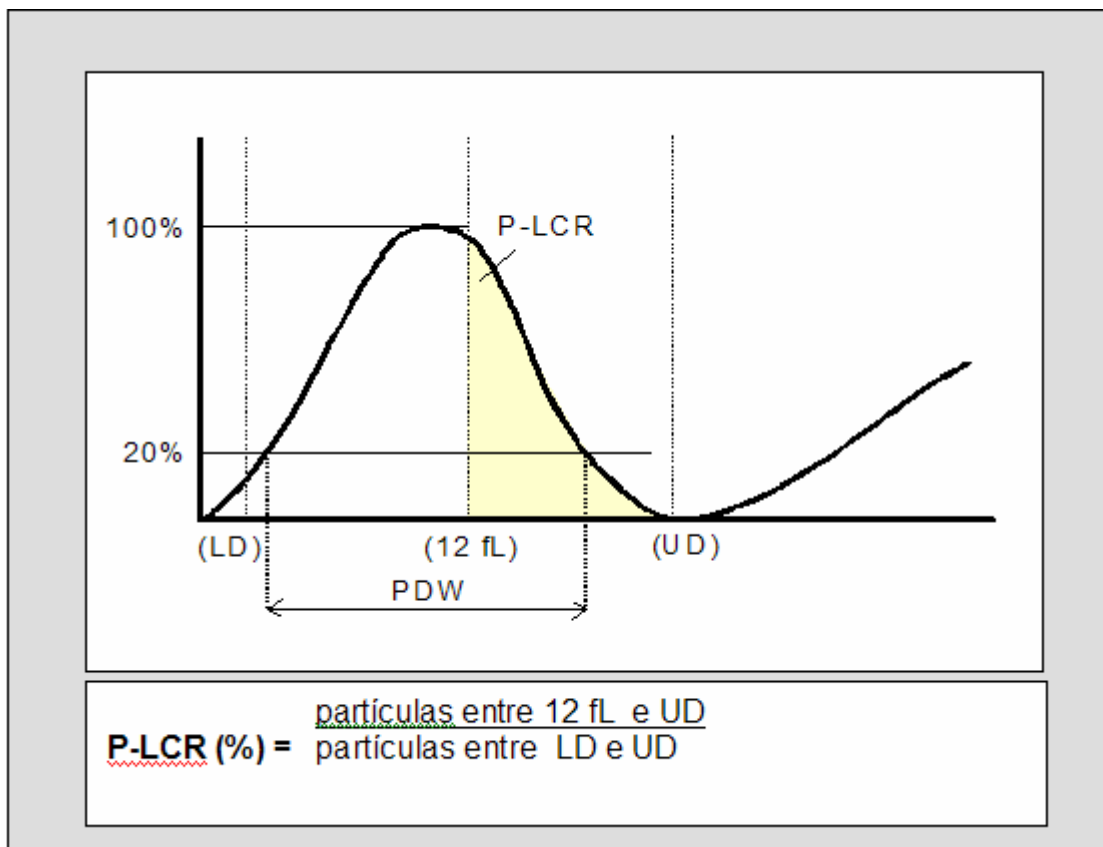
CH: crise hemolítica, CVO: crise vaso-oclusiva, GC: grupo controle, M: masculino, F: feminino, min: mínimo, max: máximo.máximo, HbSS: pacientes com anemia falciforme, HbSC: pacientes com hemoglobinopatia SC, HbSβ: pacientes com Sβ talassemia.

4- MÉTODOS

4.1- Determinação dos números de plaquetas, macroplaquetas, leucócitos

Imediatamente após a coleta, as amostras de sangue periférico colhidas em tubos a vácuo com anticoagulante K₃EDTA (Becton Dickison Vacutainer, São Paulo, Brasil), foram utilizadas na realização do hemograma completo e contagem de reticulócitos através das técnicas aplicadas pelo analisador hematológico automatizado Sysmex XE-2100 (Sysmex, Kobe, Japão). As contagens de plaquetas (PLT) foram obtidas pela técnica denominada corrente direta (DC), onde as células são classificadas pelo volume. Assim, o analisador realiza o cálculo da porcentagem de macroplaquetas (*platelet large cell ratio* (P-LCR (%))), considerando no histograma de PLT os eventos que atingiram valores acima de 12fL em relação ao total de plaquetas (Figura 1). O valor absoluto de macroplaquetas (P-LCR (#)) foi calculado a partir dos valores de P-LCR em porcentagem em relação ao número total de PLT ($P-LCR(\#) = P-LCR(\%) \times PLT (10^9/L)/100$).

As contagens de leucócitos foram obtidas por citometria de fluxo, com uso de um semicondutor *laser* de diiodo. Desta forma, as dispersões frontal e lateral isolaram os leucócitos de acordo com o volume e conteúdo celular, respectivamente.



P-LCR (%): porcentagem de macroplaquetas; PDW: distribuição do volume da população de plaquetas; LD: região de baixa distribuição; UD: região de alta distribuição.

Figura 1- Histograma de distribuição das plaquetas para a determinação do parâmetro P-LCR pelo analisador Sysmex XE-2100.

4.2- Separação e preparo das plaquetas

O sangue foi colhido em tubos a vácuo contendo o anticoagulante citrato de sódio na concentração de 3,2% (Grenner Vacuette, São Paulo, Brasil). Após um período máximo de 20 minutos o sangue foi centrifugado a 100g por 10 minutos em temperatura ambiente (22⁰C) para a separação do plasma rico em plaquetas (PRP). Imediatamente, 3 μL de PRP foram lavados com tampão fosfato preparado com albumina sérica bovina (PBS+BSA, pH=7,4) e, centrifugados a 100g por 5 minutos em temperatura ambiente.

As plaquetas isoladas foram fixadas com paraformaldeído (1%) durante 15 minutos em temperatura de 4°C. Após fixação, as plaquetas foram lavadas novamente com PBS+BSA (pH=7,4) e centrifugadas a 100g por 5 minutos em temperatura ambiente, para posterior análise por citometria de fluxo.

4.3- Marcadores Celulares

Para o estudo da expressão das plaquetas, foram utilizados 2 µL dos anticorpos monoclonais anti-complexo de GP IIb/IIIa (CD41a) - conjugado com o fluorocromo Cychrome (PECy5) (Caltag, USA) e anti- CD62p - conjugado com o fluorocromo ficoeritrina (RPE) (Caltag, USA). Após 30 minutos, foram adicionados 500 µL do fluorocromo TO (ReticCount, Becton Dickinson, Califórnia, USA) para evidenciar o conteúdo de RNA das plaquetas imaturas. As amostras ficaram protegidas da luz em temperatura ambiente durante 60 minutos, para posterior análise no citômetro de fluxo FACScalibur (Becton Dickinson, Califórnia, USA). Subseqüente à aquisição de 10.000 eventos, as emissões e edições dos resultados foram realizadas pelo software Cell Quest (Balduini, 1999; Rinder, 1998).

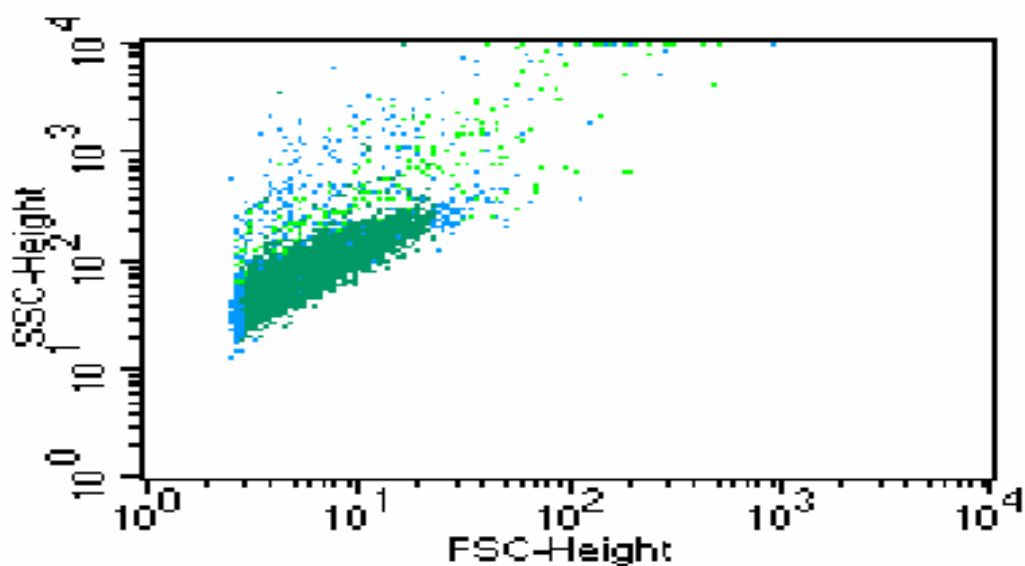
4.4- Quantificação das Plaquetas Ativadas e PRs

Na edição dos resultados, as plaquetas foram selecionadas em uma área circunscrita do citograma formado pela escalas logarítmicas das dispersões frontais (FSC) e laterais (SSC) do *laser* (Figura 2). As escalas FSC e SSC são responsáveis pela distribuição dos eventos de acordo com o volume e o conteúdo celular, respectivamente. Entretanto, para melhor separação e identificação das plaquetas, foi utilizado um outro citograma atrelado à área circunscrita do primeiro. Este citograma foi formado por duas escalas logarítmicas: da fluorescência (670nm) correspondente ao conjunto CD41a-PECy5 e da FSC (Figura 3).

As plaquetas selecionadas pelos procedimentos anteriores foram analisadas em 575nm e 525nm para verificação da expressão de CD62p-RPE (CD62p⁺) e do conteúdo de RNA marcado com *thiazole orange* (TO⁺), respectivamente (Figuras 4 e 5). As células que apresentaram eventos positivos concomitantes nos citogramas de TO e CD62P, consideramos como PRs ativadas (Figura 6).

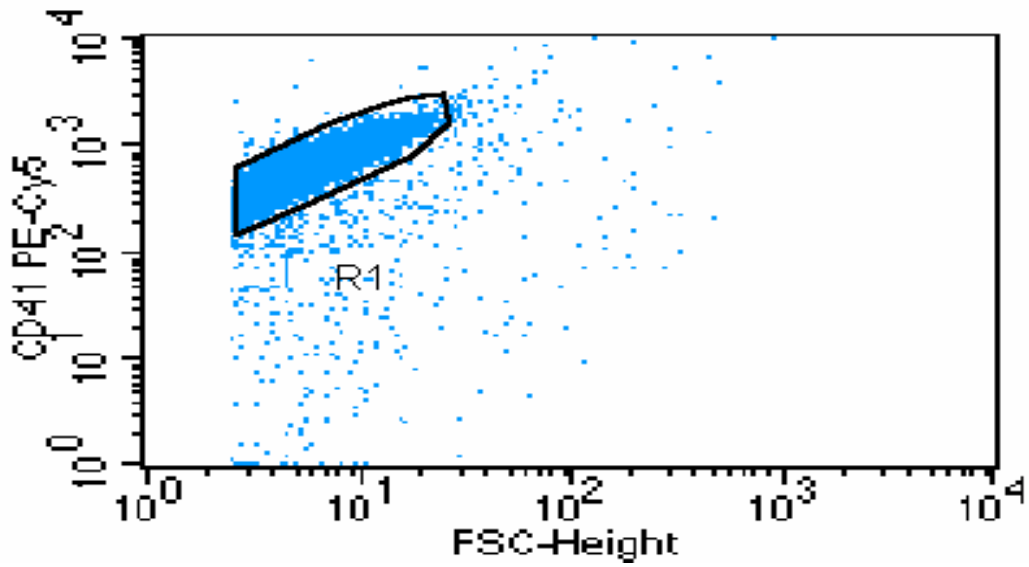
Os valores das plaquetas ativadas (CD62p⁺), PRs (TO⁺) e PRs ativadas (TO⁺/CD62p⁺) foram expressos em valores absolutos (#) após serem calculados a partir dos valores em porcentagem em relação ao número total de PLT obtido no analisador hematológico automatizado (por exemplo: PRs(#)= PRs(%) x PLT (10⁹/L)/100).

Ademais, para o estudo da intensidade de expressão da CD62p e do conteúdo de RNA, foram utilizados os índices médios de fluorescência (IMF) dos respectivos marcadores. Os valores de IMF foram representados por logarítimos dos eixos formadores dos citogramas analisados.



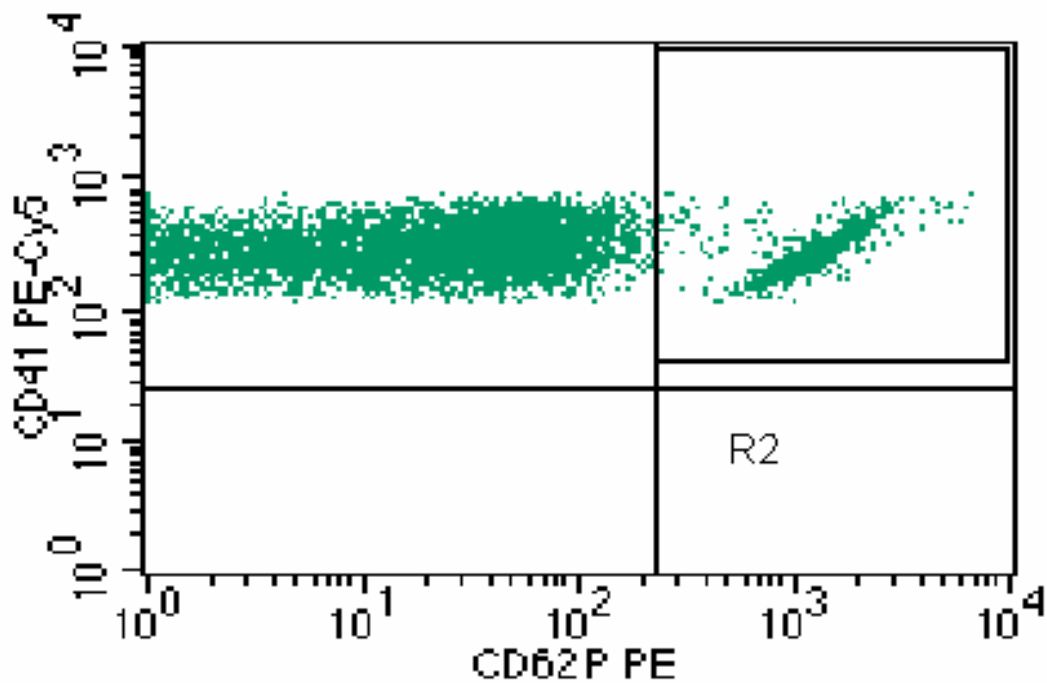
SSC: dispersão lateral do *laser*; FSC: dispersão frontal do *laser*

Figura 2- Citograma de separação das plaquetas por método óptico. O eixo FSC corresponde ao volume e o eixo SSC ao conteúdo das plaquetas.



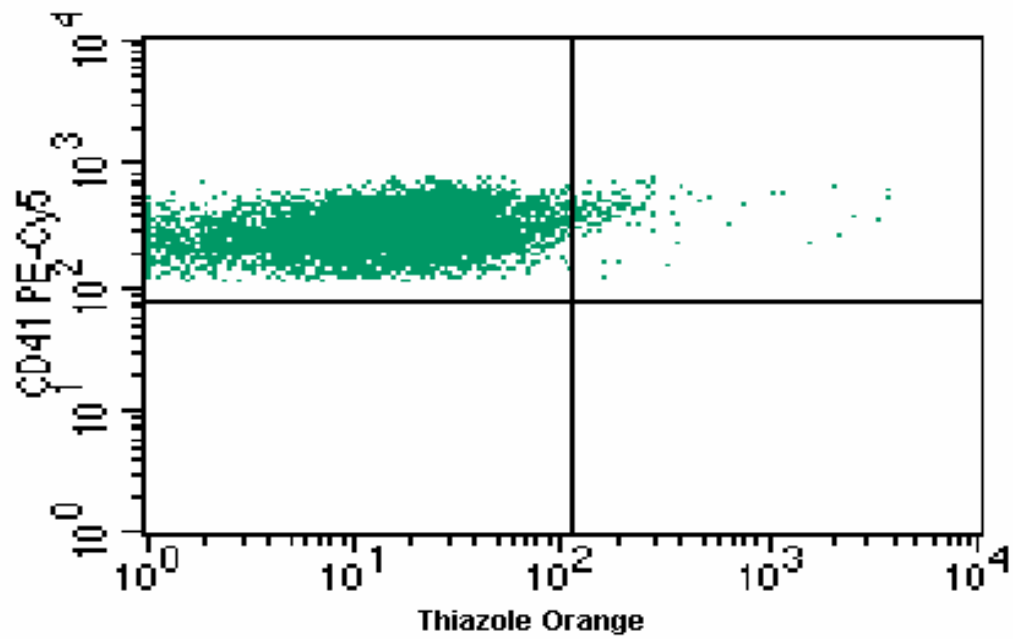
CD41a-PECy5: anticorpo monoclonal anti – complexo GP IIb/IIIa + fluorocromo Cychrome;
FSC: dispersão frontal do *laser*

Figura 3- Citograma de separação das plaquetas marcadas com anticorpo monoclonal específico. O *gate* R1 representa as plaquetas através da expressão de CD41a e distribuição por volume (FSC).



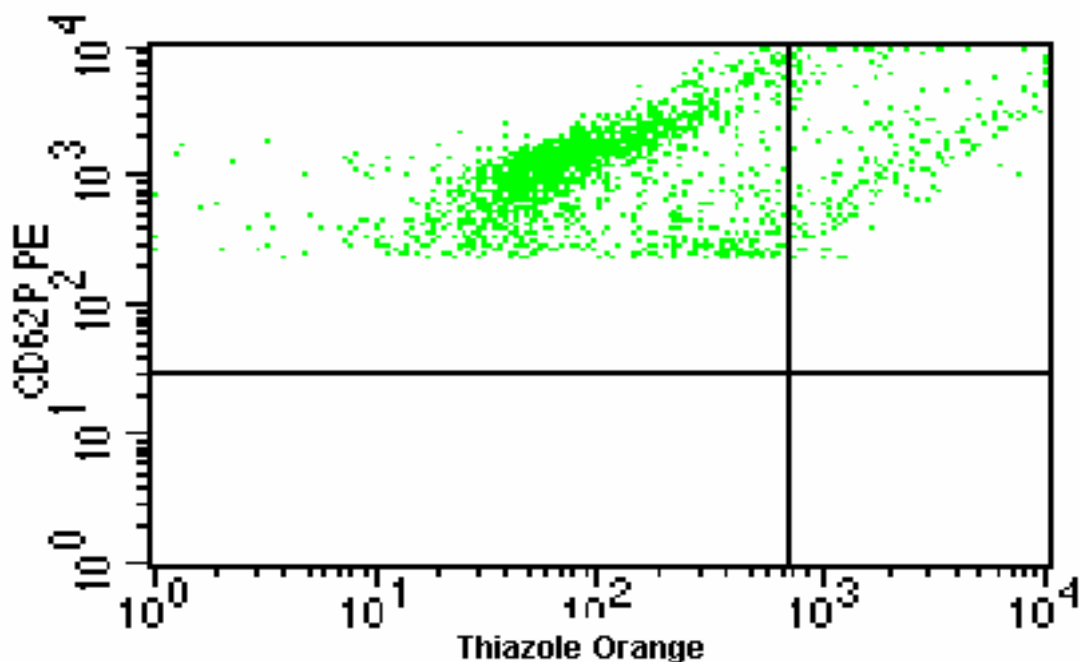
CD41a-PECy5: anticorpo monoclonal anti – complexo GP IIb/IIIa + fluorocromo Cychromo;
 CD62P-PE: anticorpo monoconal anti-P-selectina + fluorocromo ficoeritrina

Figura 4- Citograma de identificação e quantificação das plaquetas ativadas. O quadrante superior direito (R2) representa as plaquetas que expressam CD62p.



CD41a-PECy5: anticorpo monoclonal anti – complexo GP IIb/IIIa + fluorocromo Cychrome;
thiazole orang: marcador de RNA

Figura 5- Citograma de identificação e quantificação das PRs.O quadrante superior direito representa as plaquetas com conteúdo de RNA (TO⁺).



CD62P-PE: anticorpo monoconal anti-P-selectina + fluorocromo ficoeritrina; *thiazole orange*; marcador de RNA.

Figura 6- Citograma de identificação e quantificação das PRs ativadas. O quadrante superior direito representa as plaquetas com conteúdo de RNA e expressão de CD62p. Este citograma foi obtido a partir do *gate* R2 presente na Figura 4.

4.5- Dosagem dos níveis séricos de P-selectina, TPO, IL-3 e IL-6

Concomitante às coletas de sangue com K₃EDTA e citrato de sódio (3,2%), as amostras de sangue periférico foram colhidas em tubos a vácuo sem anticoagulante. Para a obtenção do soro a amostra colhida sem anticoagulante foi centrifugada a 500g por 10 minutos. O volume de soro foi dividido em 4 alíquotas que foram acondicionadas e estocadas em freezer a - 80⁰C até o momento de uso.

As dosagens de sCD62p (Limite de detecção: 0-50 ng/mL; Ref.: BBE6 (R&D Systems, Inc., USA)), TPO (Limite de detecção: 31.2 - 2000 pg/mL; Ref.: DTP008 (R&D Systems, Inc., USA)), IL-3 (Limite de detecção: 31.2 - 2000 pg/mL; Ref.: D3000 (R&D

Systems, Inc., USA)) e IL-6 (Limites de detecção: 0.156 – 10 pg/mL e 3.13 – 300 pg/mL; Ref.: HS600B e D6050, respectivamente (R&D Systems, Inc., USA)) foram realizadas pela técnica de ELISA em duplicata.

4.6- Análise Estatística

Na comparação estatística entre os grupos estudados, foram utilizados os testes de Kruskal-Wallis e Mann-Whitney, considerando estatisticamente significantes os resultados que apresentaram o valor de $p < 0,05$ (5%). O coeficiente de correlação de Spearman foi adotado na avaliação da relação entre as variáveis estudadas.

Todos os cálculos estatísticos foram realizados pelo Serviço de Estatística da Câmara de Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas/UNICAMP, onde foi usado o Sistema de Análise Estatística (SAS) aplicado ao Windows, versão 6.1.2 (SAS Institute Inc, 1989-1996, NC, USA).

5- RESULTADOS

Considerando como valor de normalidade as contagens de plaquetas entre 150 e 400 x10⁹/l) adotado no Laboratório de Hematologia da Divisão de Patologia Clínica HC/UNICAMP, a trombocitose (PLT > 400 x10⁹ /l) foi comum a todas as fases das SF, assim como o P-LCR (#) foi significativamente superior nas três fases clínicas da doença em relação ao GC. Entre os diferentes estágios clínicos, valores mais elevados foram observados na CVO (mediana = 129.02 x 10⁹/L) quando comparados à fase “estável” (mediana = 90.67 x 10⁹/L) e à CH (mediana = 99.01 x 10⁹/L; p=0.0060 e p=0.0362, respectivamente) (Tabelas 2 e 3) (Figura 7). Entretanto, em números percentuais as contagens de P-LCR foram inferiores nas diferentes fases da doença quando comparadas ao GC (Tabelas 2 e 3).

Em todas as fases das SF o número absoluto de plaquetas ativadas (CD62p⁺), PRs (TO⁺) e PRs ativadas (TO⁺/CD62p⁺) mostraram valores aumentados em relação ao GC (Tabela 2).

Durante a CVO o número de PRs (#) (mediana = 7.94 x 10⁹/L) e plaquetas CD62p⁺ (mediana = 11.25 x 10⁹/L) foram mais elevados do que na fase “estável” (PRs: mediana = 2.08 x 10⁹/L, CD62p⁺: mediana = 2.25 x 10⁹/L, respectivamente). O número de PRs foi significativamente superior na CVO do que na CH (p=0,0494). Não houve diferença no número de TO⁺/CD62p⁺ entre os três tipos de estágios clínicos, ao contrário da comparação entre GC e pacientes (Tabelas 2 e 3).

Tabela 2- Análise descritiva dos parâmetros estudados

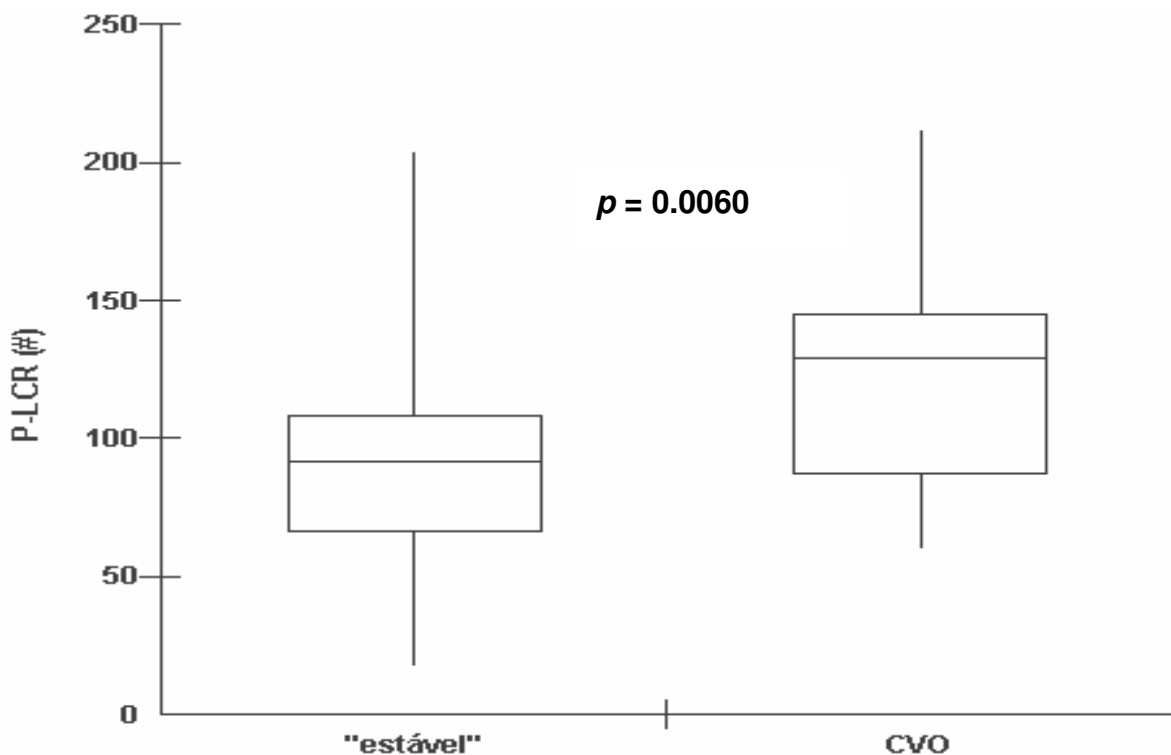
Variáveis (unidade)	GC Mediana (mín. – máx.)	fase “estável” Mediana (mín. – máx.)	CH Mediana (mín. – máx.)	CVO Mediana (mín. – máx.)
PLT (10 ⁹ /L)	236 (181 – 341)	443 (67 – 1030)	371 (228 – 765)	491 (293 – 739)
P-LCR (%)	28.0 (13.6 – 37.9)	22.4 (16.4 – 31.7)	22.5 (12.8 – 48)	25,2 (8,8 – 40,9)
P-LCR (10 ⁹ /L)	62.41 (36.48 – 98.89)	90.67 (17.55 – 203.35)	99.01 (38.14 – 223.68)	129.02 (60.28 – 211,10)
CD62p+ (10 ⁹ /L)	2,25 (1,12– 19,78)	5.62 (0.45– 44.91)	5.20 (2.20– 21.08)	11.25 (2.69– 53.47)
PRs (10 ⁹ /L)	2.08 (0.29 – 17.89)	4.86 (0.58- 16.27)	3.12 (0.60– 16,89)	7.94 (1,12– 19,78)
TO+/CD62p+ (10 ⁹ /L)	39.96 (15.78 – 113.48)	69.5 (8.85– 264.51)	93.77 (21.17– 296.98)	98.74 (14.82– 288.85)
IL-6 (pg/mL)	1.34 (0.74– 3.24)	1.5 (0.58– 9.62)	5.21 (0.5– 194.7)	5.11 (1.52– 404.5)
IL-3 (pg/mL)	0 (0– 116,4)	21.1 (0 – 72.4)	23.5 (0 – 1262.6)	23.5 (0 – 65.2)
TPO (pg/mL)	172.23 (113.4 – 332)	206.2 (124.5 – 1524.1)	264.5 (122.9 – 662.7)	236.0 (107.1 – 756.0)
sCD62p (ng/mL)	5.83 (2.39 – 22.2)	6.37 (3.34 – 18.2)	7.0 (3.52 – 14.0)	8.4 (3.89 – 22.7)
Leucócitos (10 ⁹ /L)	6.3 (3.3 – 9.3)	8.3 (4.8 – 18.8)	10.1 (5.1 – 16.2)	11.4 (4.3 – 20.6)

PLT: contagem de plaquetas; P-LCR: macroplaquetas no sangue periférico; CD62p⁺: plaquetas ativadas; PRs: plaquetas reticuladas; IL-6: interleucina 6; IL-3: interleucina 3; TPO: trombopoietina; sCD62p: P-selectina solúvel; mín.: mínimo; máx.: máximo.

Tabela 3- Parâmetros plaquetários: comparação entre os grupos de pacientes e controle

Grupos	sCD62P		P-LCR (%)		P-LCR (#)		CD62P+(#)		PRs (#)		TO+/CD62P+(#)	
	Med: Med:	Med: Med:	Med: Med:	Med: Med:	Med: Med:	Med: Med:	Med: Med:	Med: Med:	Med: Med:	Med: Med:	Med: Med:	
	valor de p	valor de p	valor de p	valor de p	valor de p	valor de p	valor de p	valor de p	valor de p	valor de p	valor de p	
GC versus “estável”	5.83 6.37 0.3838	28.0 22.4 0.0003	62.41 90.67 0.0005	2.25 5.62 0.0007	2.08 4.86 0.0230	39.96 69.5 0.0270						
GC versus CH	5.83 7.0 0.1210	28.0 22.5 0.0512	62.41 99.01 0.0011	2.25 5.20 0.0001	2.08 3.12 <0.00001	39.96 93.77 0.0008						
GC versus CVO	5.83 8.4 0.0482	28.0 25.2 0.1234	62.41 129.02 < 0.00001	2.25 11.25 0.0001	2.08 7.94 <0.00001	39.96 98.74 0.0002						
“estável” versus CH	6.37 7.0 0.5314	22.4 22.5 0.4640	90.67 99.01 0.6083	5.62 5.20 0.3018	4.86 3.12 0.2015	69.5 93.77 0.5359						
“estável” versus CVO	6.37 8.4 0.0686	22.4 25.2 0.1860	90.67 129.02 0.0060	5.62 11.25 0.0291	4.86 7.94 0.0122	69.5 98.74 0.2303						
CH versus CVO	7.0 8.4 0.4616	22.5 25.2 0.7989	99.01 129.02 0.0362	5.20 11.25 0.1590	3.12 7.94 0.0494	93.77 98.74 0.4850						

sCD62p: P-selectina solúvel; P-LCR (#): valor absoluto de macroplaquetas no sangue periférico; CD62p⁺ (#): valor absoluto de plaquetas ativadas; PRs (#): valor absoluto de plaquetas reticuladas; TO⁺/CD62p⁺ (#): valor absoluto de plaquetas reticuladas e ativadas; Med: mediana dos grupos comparados; “estável”: pacientes em fase “estável”; CH: crise hemolítica; CVO: crise vaso-oclusiva; GC: grupo controle.



P-LCR#: número absoluto de macroplaquetas; “estável”: pacientes em fase “estável”; CVO: crise vaso-oclusiva.

Figura 7- “Boxplots” (mediana e quartis) das contagens absolutas de macroplaquetas nas fases “estável” e CVO dos pacientes com SF.

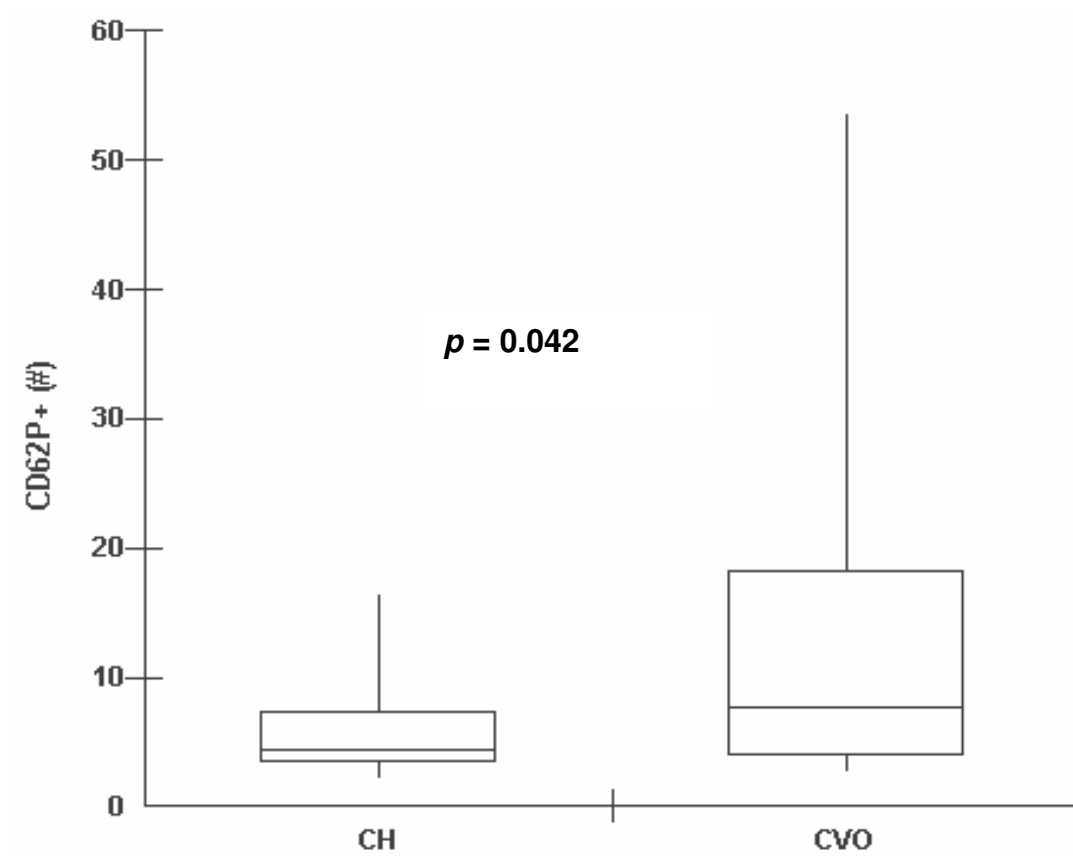
Comparando pacientes HbSS e HbSC na CVO, os pacientes SS (mediana= $14.40 \times 10^9/L$) mostraram número de plaquetas $CD62p^+$ significativamente mais elevados do que o grupo SC (mediana = $7.60 \times 10^9/L$, $p=0.042$) (Figura 8). No grupo de pacientes em fase “estável”, as PRs dos indivíduos $S\beta$ talassêmicos (IMF $CD62p^+$ (PRs): mediana = 2457.14) apresentaram menor intensidade de ativação quando comparadas aos pacientes SS (IMF $CD62p^+$ (PRs): mediana = 3702.79) e SC (IMF $CD62p^+$ (PRs): mediana= 2837.71, $p=0.0006$ e $p=0.0101$, respectivamente). Entretanto não houve diferença entre os pacientes SS e SC ($p=0.1711$) (Figura 9).

Em todos os grupos, a análise da expressão de CD62p nas PRs medida através da intensidade média de fluorescência de CD62p (IMF-CD62p), mostrou que as plaquetas imaturas possuem maior grau de ativação do que as plaquetas maduras ($p < 0,00001$ em todos os grupos) (Figura 10).

Ademais, em todas as fases das SF a elevação do número de plaquetas CD62p⁺ correlacionam com número de PRs (fase “estável”: $r=0.5742$, $p=0.0065$; CH: $r=0.5560$, $p=0.0088$; CVO: $r=0.6649$, $p=0.0019$). A correlação entre PRs e os níveis séricos de sCD62p ($r=0.7710$, $p=0.0001$) foi observada apenas no grupo de pacientes em fase “estável” da doença (Tabela 4).

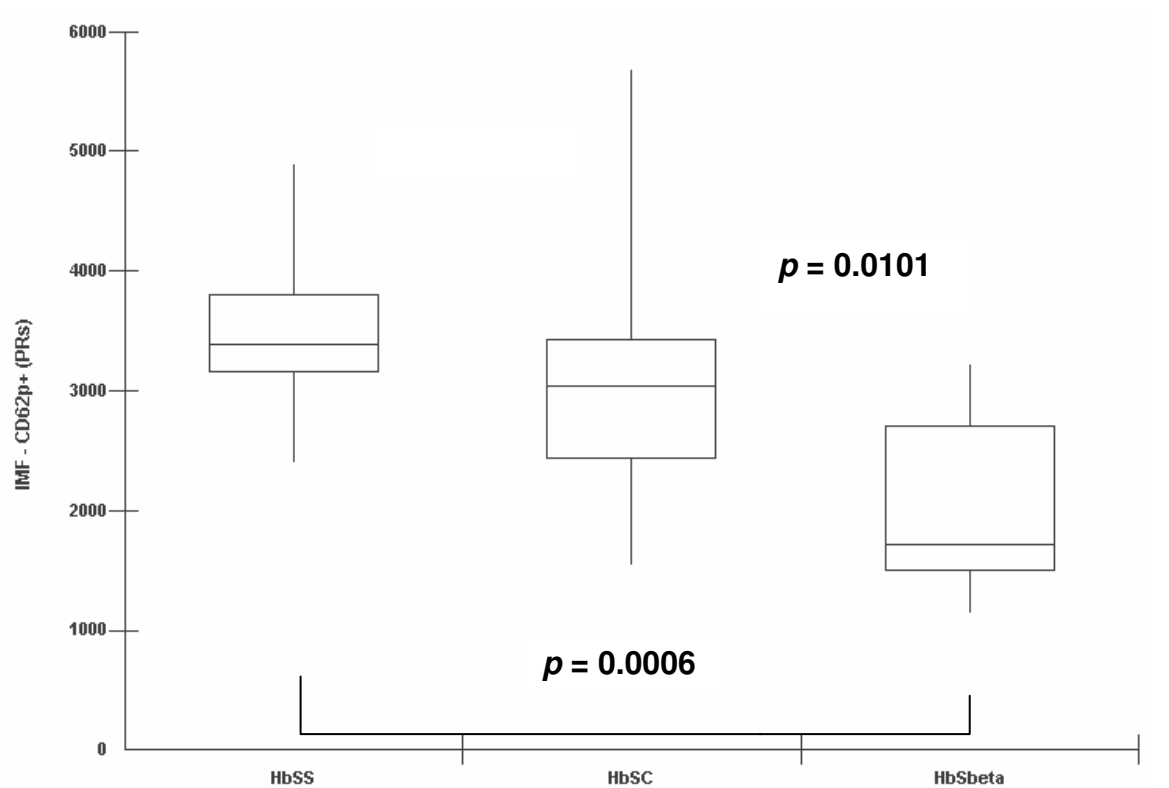
Durantes as crises os pacientes apresentaram altos níveis de IL-6 (CH: mediana = 5.21 pg/mL; CVO: mediana = 5.11 pg/mL) e um aumento significativo no número de leucócitos circulantes (CH: mediana = $10.1 \times 10^9/L$; CVO: mediana = $11.4 \times 10^9/L$) quando comparados ao GC (IL-6: mediana = 1.34 pg/mL; Leucócitos: mediana = $6.3 \times 10^9/L$) e pacientes em fase “estável” (IL-6: mediana = 1.5 pg/mL; Leucócitos: mediana = $8.3 \times 10^9/L$). Níveis séricos elevados de IL-3 (fase “estável”: mediana = 21.1 pg/mL; CH: mediana = 23.5 pg/mL; CVO: mediana = 23.5 pg/mL) e TPO (fase “estável”: mediana = 206.2 pg/mL; CH: mediana = 264.5 pg/mL; CVO: mediana = 236.0 pg/mL) foram observados em todos os grupos de pacientes em relação ao GC (IL-3 : mediana = 0 pg/mL; TPO: mediana = 172.23 pg/mL). Entretanto, entre os grupos de pacientes não houve diferença significativa (Tabela 5).

A comparação entre os grupos em uso ou não de HU não foi realizada, devido ao pequeno número de pacientes por sub-grupo.



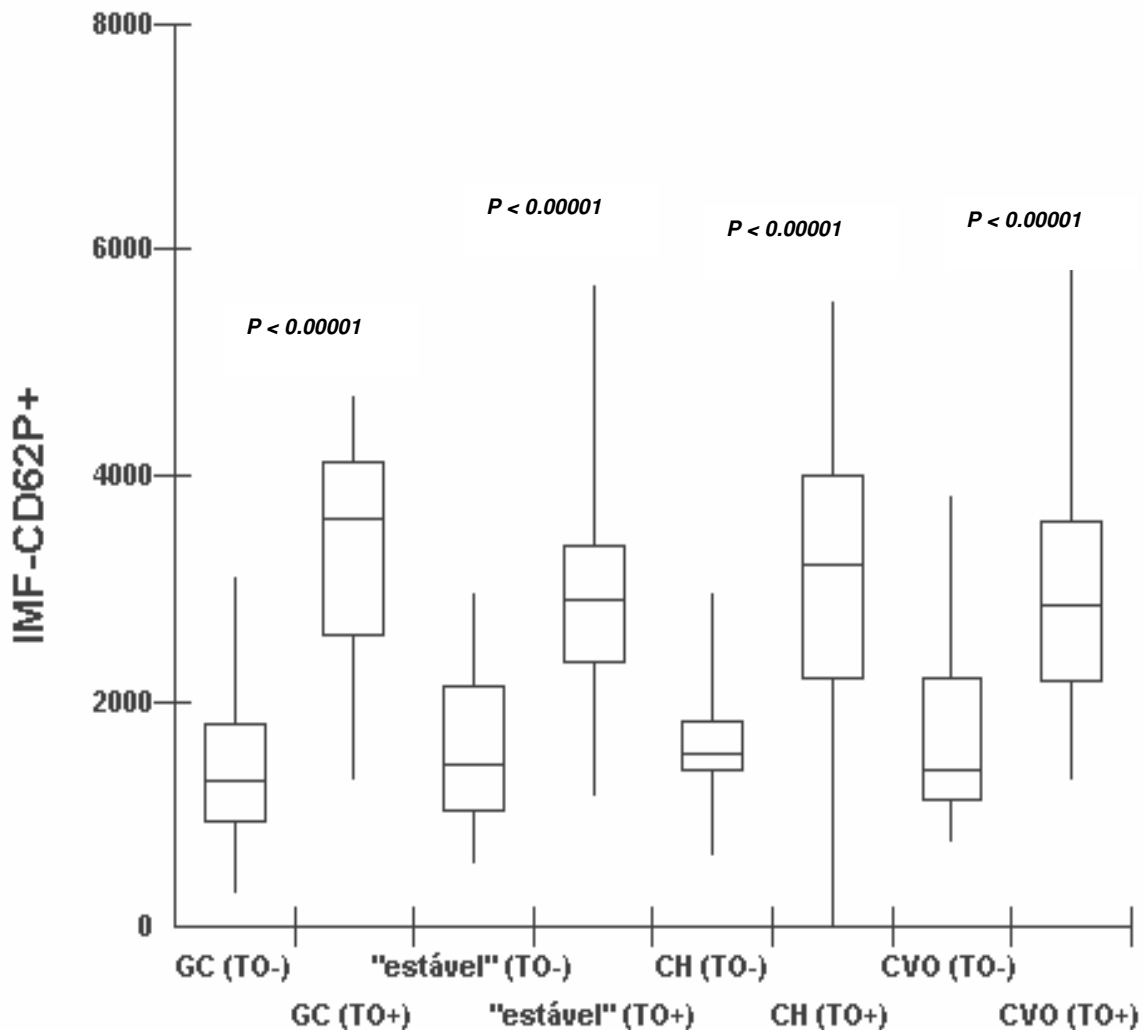
CD62P+: plaquetas ativadas; HbSC: hemoglobinopatia SC; HbSS: anemia falciforme

Figura 8- “Boxplots” (mediana e quartis) das contagens absolutas de plaquetas ativadas nos grupos de pacientes com HbSS e HbSC em CVO.



IMF-CD62p⁺ (PRs): intensidade média de fluorescência das plaquetas ativadas e reticuladas; HbSS: pacientes com anemia falciforme; HbSbeta: pacientes com HbS β , HbSC: pacientes com hemoglobinopatia SC.

Figura 9- “Boxplots” (mediana e quartis) dos valores de intensidade de ativação das PRs nos grupos de pacientes com HbSS, HbSC e HbS β na fase “estável”.



MIF-CD62P+: intensidade média de fluorescência das plaquetas ativadas; “estável” (TO-): plaquetas maduras na fase “estavel”; “estável” (TO+): plaquetas reticuladas na fase “estavel”; CH (TO-): plaquetas maduras na crise hemolítica; CH (TO+): plaquetas reticuladas na crise hemolítica; CVO (TO-): plaquetas maduras na crise vaso-oclusiva; CVO (TO+): plaquetas reticuladas na crise vaso-oclusiva; GC (TO-): plaquetas maduras no grupo controle; GC (TO+): plaquetas reticuladas no grupo controle.

Figura 10- “Boxplots” (mediana e quartis) mostrando em todos grupos a diferença de intensidade de ativação entre as PRs e as plaquetas maduras.

Tabela 4- Correlações entre parâmetros referentes às plaquetas, dosagens de ILs e TPO em pacientes com SF. Valor de r: coeficiente de Spearman e grau de significância (valor de p).

Parâmetros	fase “estável”	CH	CVO
CD62p+ # x PRs #	0.5742 (0.0065)	0.5560 (0.0088)	0.6649 (0.0019)
sCD62p (ng/mL) x PRs #	0.7710 (0.0001)	-0.2323 (0.2436)	0.3870 (0.0969)
CD62p+ # x IL-6	0.1102 (0.5102)	0.1176 (0.5592)	0.1713 (0.4235)
CD62p+ # x IL-3	0.0093 (0.9558)	0.2309 (0.1464)	0.2702 (0.2015)
CD62p+ # x TPO	0.2395 (0.1474)	- 0.1390 (0.4894)	0.1574 (0.4626)
PRs # x IL-6	- 0.0050 (0.9761)	0.2955 (0.1345)	0.1913 (0.3705)
PRs # x IL-3	0.0854 (0.6102)	0.2858 (0.1483)	0.2054 (0.3356)
PRs # x TPO	0.1600 (0.3372)	-0.0173 (0.9319)	0.3261 (0.0887)
TO+/CD62p+ # x IL-6	- 0.3002 (0.0670)	0.3321 (0.0722)	-0.1678 (0.4331)
TO+/CD62p+ # x IL-3	0.1338 (0.4233)	0.1118 (0.5787)	-0.0923 (0.6681)
TO+/CD62p+ # x TPO	0.3189 (0.0812)	-0.3220 (0.0862)	-0.2322 (0.2749)

CD62p⁺ (#): número absoluto de plaquetas ativadas; PRs (#): número absoluto de plaquetas reticuladas; sCD62p: P-selectina solúvel; TPO: trombopoietina; CH: crise hemolítica; CVO: crise vaso-oclusiva; TO⁺/CD62p⁺ #: plaquetas reticuladas e ativadas; IL-6: interleucina 6; IL-3: interleucina 3.

Tabela 5- Comparação entre os grupos referentes às dosagens das ILs, TPO, contagem de leucócitos.

Grupos	IL-6		Leucócitos		IL-3		TPO	
	Med:	Med:	Med:	Med:	Med:	Med:	Med:	Med:
	valor de p		valor de p		valor de p		valor de p	
GC versus “estável”	1.34	1.50	6.3	8.3	0	21.1	172.23	206.2
	0.2965		0.0004		0.0001		0.025	
GC versus CH	1.34	5.21	6.3	10.1	0	23.5	172.23	264.5
	< 0.00001		< 0.00001		0.0001		0.001	
GC versus CVO	1.34	5.11	6.3	11.4	0	23.5	172.23	236.0
	< 0.00001		< 0.00001		0.0003		0.003	
“estável” versus CH	1.50	5.21	8.3	10.1	21.1	23.5	206.2	264.5
	< 0.00001		0.0001		0.3528		0.4210	
“estável” versus CVO	1.50	5.11	8.3	11.4	21.1	23.5	206.2	236.0
	< 0.00001		0.0009		0.6282		0.4225	
CH versus CVO	5.21	5.11	10.1	11.4	23.5	23.5	264.5	236.0
	0.6577		0.8135		0.6059		0.9684	

IL-6: interleucina 6; IL-3: interleucina 3; TPO: trombopoietina; “estável”: pacientes em fase “estável”; Med: mediana dos grupos comparados; CH: crise hemolítica; CVO: crise vaso-oclusiva; GC: grupo controle.

6- DISCUSSÃO

O desenvolvimento do processo vaso-oclusivo em pacientes com doença falciforme é atribuído à retenção de eritrócitos falcizados (rígidos) no endotélio vascular, desencadeando a formação dos trombos subseqüentes aos danos teciduais e geração de trombina (Francis e Johnson, 1991). As plaquetas contribuem para a trombogênese da doença falciforme fixando-se no endotélio lesado. A ativação, que precede a fixação, é marcada pela geração de tromboxana A₂, secreção dos grânulos densos e clivagem da trombina ligada ao seu receptor plaquetário. Esse conjunto de eventos é considerado uma importante via da trombogênese vascular (Colman et al., 1994).

O processo de fixação das plaquetas é mediado por rearranjo do complexo GPIIb/IIIa (CD41a) na membrana citoplasmática, transformando-o em receptor de proteínas adesivas. Desta forma, a interação entre receptor e fibrinogênio na presença do cálcio permite a formação do agregado plaquetário no local da vaso-oclusão, levando ao consumo de plaquetas (Hynes, 1994).

As principais evidências da ativação das plaquetas são as secreções granulares de ADP, fator 4 de plaquetas, β -tromboglobulina) e a CD62p. Durante a ativação, a expressão da CD62p na superfície da membrana citoplasmática da plaqueta é o resultado da secreção do grânulos α (Tomer et al., 2001).

Em nosso estudo, a participação das plaquetas na fisiopatologia SF foi avaliada por diferentes parâmetros laboratoriais. Através dos valores de P-LCR (#), observamos o aumento do número de macroplaquetas circulantes em todos os grupos de pacientes, sendo mais evidente na CVO. Amin et al. (2004) consideraram a variabilidade de tamanhos de plaquetas como o sinal do “stress” proliferativo na medula óssea de pacientes com doença falciforme. Usando um analisador hematológico automatizado, os autores estudaram a variabilidade de volume pelo cálculo da distribuição do volume no histograma de plaquetas (PDW). Assim, os valores de PDW foram significativamente maiores na CVO (Amin et al., 2004). A asplenia funcional presente na doença falciforme compromete o sequestro esplênico das células senescentes ou danificadas, alargando o tempo de permanência das plaquetas. Conseqüentemente, há uma maior freqüência de micro-partículas de plaquetas (MPPs) circulantes (Erslev et al., 2001; Wun et al., 1997).

Nossos resultados mostraram baixas porcentagens de macroplaquetas nos diferentes grupos de pacientes em relação ao GC, sugerindo uma variabilidade de volume devido a frequência de macroplaquetas, plaquetas senescentes e MPPs. A presença de uma população plaquetária constituída por plaquetas de diversas idades é uma importante causa da trombocitose presente nas SF, mas não pode ser considerada como causa única. Sabe-se que o elevado consumo de plaquetas, principalmente na CVO, promove o aumento da atividade trombopoética com subsequente trombocitose, em associação com elevados níveis plasmáticos dos produtos secretados por plaquetas (Tomer et al., 2001).

Quanto à ativação, nosso estudo mostrou que, os pacientes em CVO apresentaram aumento significativo do número de plaquetas CD62p⁺, quando comparados aos outros grupos estudados. Nossos resultados confirmam estudos anteriores. Wun et al. (1997), mostraram que há uma diminuição da agregação plaquetária com o uso *in vitro* de ADP e epinefrina na fase “estável”. A diminuição da agregação foi interpretada como resultado da baixa expressão de CD62p, devido à parcial degranulação das plaquetas na fase “estável” (Wun et al., 1997). Por outro lado, na CVO ocorre a translocação da CD62p da membrana do grânulo- α para a superfície da membrana citoplasmática da plaqueta, sendo esse processo considerado como um marcador da secreção granular e da ativação plaquetária (Hynes, 1992). Outro estudo mostrou que a combinação de trombocitose, baixo volume plaquetário e baixo conteúdo de P-selectina intraplaquetária na doença falciforme conferem um estado trombótico aos pacientes (Mohan et al., 2006). A depressão intracelular decorre da rápida cinética de expressão da CD62p na CVO como mediadora da adesão dos eritrócitos falcizados ao endotélio (Wagner et al., 2005). Segundo Matsui et al. (2002) o papel da CD62p na CVO pode ser demonstrado pelo uso da heparina. O anticoagulante mostrou-se capaz de inibir a P-selectina e outras selectinas, diminuindo os eventos adesivos presentes no processo vaso-oclusivo.

Na ativação e adesão, as plaquetas podem exteriorizar a P-selectina mobilizada nos grânulos α , aumentando os níveis séricos de sCD62p (Moham et al., 2006). Estudos mostraram elevados níveis de sCD62P em pacientes com doença falciforme (Blann et al, 2003; Tomer et al., 2001). No nosso estudo, onde os pacientes foram sub-divididos de acordo com o estado clínico, os níveis séricos de sCD62p foram elevados nos pacientes em CVO, quando comparados com o GC.

Portanto, com os nossos resultados e as demais observações relatadas, sugerimos que as PLT CD62p⁺ contribuem para a trombogênese da CVO através da expressão e exteriorização de uma selectina mediadora da adesão entre as células sanguíneas e o endotélio vascular.

As PRs são descritas como células grandes, densas e potencialmente mais ativas que as plaquetas maduras (Mohan et al., 2006; McCabe et al., 2004). Na condição de primeira avaliação das PRs nas SF, mostramos o aumento significativo do número de PRs e de sua atividade em todas as fases clínicas da doença. Nos pacientes em fase “estável”, observamos a correlação entre PRs e sCD62P. Ademais, em todos os grupos as PRs mostraram maior expressão de CD62p quando comparadas às plaquetas maduras. O comportamento das PRs foi descrito em outras patologias. Nos acidentes vasculares cardioembólicos, as constantes ativações das plaquetas levam a uma maior atividade trombopoietica em consequência do aumento do “turnover” plaquetário. Confirmando a alta atividade trombopoietica, os autores observaram uma maior frequência de PRs circulantes (Nakamura et al., 2002). Himmelfarb et al. (1997) mostraram o aumento da porcentagem de PRs no sangue periférico de indivíduos submetidos à diálise. A elevação da atividade trombopoietica seria um reflexo das repetitivas ativações decorrentes da interação entre plaquetas e as membranas de diálise (Reverter et al., 1994). Nos pacientes com insuficiência renal crônica tratados com eritropoietina recombinante humana (rHuEPO), foi observado uma melhora das funções das plaquetas, principalmente no que diz respeito à agregabilidade (Malyszko et al., 1995). Tássie et al. (1998), sugeriram que a melhora das funções das plaquetas com o uso da rHuEPO foi decorrente da liberação de plaquetas jovens (PRs) para o sangue periférico, plaquetas essas consideradas como células metabolicamente mais ativas. Na recuperação medular pós-quimioterapia, foi observado o aumento do número de PRs acompanhado da elevação dos valores de P-LCR, PDW e volume médio das plaquetas (VPM) (Balduini et al, 1999).

De acordo com nossa análise, o aumento do número absoluto de PRs nos pacientes com SF, sugerem uma constante atividade trombopoietica. Diferentemente do esperado não houve correlação entre o número de PRs e P-LCR, embora ambos estivessem aumentos. Entretanto não podemos afirmar que todas as PRs são macroplaquetas.

Além disso, a correlação das PRs com o número de PLT CD62p⁺ associada à maior intensidade de ativação, sugerem o alto nível de ativação das PRs, provavelmente decorrente da intensa atividade trombopoietica resultante das repetitivas interações entre plaquetas, eritrócitos falcizados e endotélio vascular. Curiosamente, somente na fase “estável” foi observada a correlação entre PRs(%) e sCD62p, resultado de difícil interpretação, uma vez que os níveis séricos de sCD62p são regulados pelos processos de ativação e adesão (Moham et al., 2006). Todavia, não encontramos a mesma correlação nos pacientes em CVO, onde ativação e adesão são mais frequentes.

Nossos resultados ainda reforçam o argumento de que as PRs são potencialmente mais ativas, quando comparadas às plaquetas maduras e sugerem a participação das PRs na trombogênese da CVO. Portanto, o grande número de PRs no sangue periférico de pacientes com SF, provavelmente aumentam o riscos de vaso-oclusão e eventos trombóticos. Utilizando os mesmos argumentos, sugerimos que os riscos são maiores na HbSS e na Hb SC do que na HbSβ. Tal fato pode ser explicado pelo alto grau de polimerização da hemoglobina e falcização dos eritrócitos nos indivíduos com HbSS (Wagner et al. 2005; Somjee et al., 2004), e na tendência particular à trombose e embolismo pulmonar que apresentam os pacientes com HbSC (Hoffbrand e Pettit, 1993) do que na HbSβ.

Várias investigações tem sido realizadas com o intuito de melhor entender o papel da inflamação na doença falciforme (Rodrigues et al., 2006; Pathare et al., 2003). Estudos mostraram que as células falciformes interagem com plaquetas, leucócitos, proteínas plasmáticas e endotélio vascular, causando infartos em diferentes órgãos devido à redução do fluxo sanguíneo. Diversas moléculas são mediadoras da adesão das células sanguíneas à parede do vaso. Como exemplos podemos citar: P-selectina, L-selectina, molécula de adesão intercelular (ICAM) e molécula-1 de adesão plaquetas-endotélio (PECAM-1). Assim, o processo de vaso-oclusão é desencadeado com subsequente dor, infarto e isquemia (Pathare et al., 2003). Além da interação celular, substâncias vasoativas, ILs e radicais de oxigênio são liberados por leucócitos, provocando danos oxidativos e o aumento da reação inflamatória (Okpala, 2004).

Estudos anteriores mostraram o aumento dos níveis séricos de algumas citocinas pró-inflamatórias na doença falciforme. Mesmo na fase “estável”, a produção de citocinas está associada ao dano do endotélio pelos eritrócitos falcizados, produzindo micro-infartos considerados subclínicos (Pathare et al., 2004). Com a lesão, o endotélio é estimulado à produzir IL-1 β , IL-6 e IL-8 e fator de necrose tumoral (TNF- α) (Pathare et al., 2004; Hebbel et al., 1997). Na CVO, a IL-6 e TNF- α liberadas na área de oclusão, estimulam a produção hepática das proteínas de fase aguda do processo inflamatório, como a proteína C-reativa e a ferritina (Baumann e Gauldie, 1994). Pathare et al. (2004) estudando os diferentes períodos clínicos da doença falciforme, mostraram elevados níveis de IL-6 na fase “estável” e CVO quando comparados com o grupo controle. Ademais, outros autores consideraram a IL-6 como uma citocina ativadora da trombocitose reativa ou paraneoplásica (Blay et al., 1993). Nossos resultados confirmaram os anteriores e sugerem que as elevações dos níveis séricos de IL-6 são mais evidentes nas crises, em consequência do maior frequência dos eventos vasculares. Entretanto, os valores dos parâmetros plaquetários não foram influenciados pelos níveis de IL-6.

Dentre as citocinas, há interleucinas e substâncias que são liberadas em resposta ao “stress” ou às condições patológicas, influenciando a hematopoiese através do estímulo ou inibição da diferenciação e proliferação celulares. As IL-3, IL-7 e o fator estimulante de células tronco (SCF) agem estimulando a hematopoiese, enquanto o IFN- γ e TNF- α inibem a eritropoiese (Weiss, 1999). Sabemos que a ação conjunta da IL-3 e EPO estimulam os progenitores eritróides (Pathare et al., 2004). Como esperado, a nossa análise mostrou altos níveis séricos de IL-3 nos grupos de pacientes, provavelmente relacionados à reação inflamatória comum às diferentes fases das SF. Todavia, não foi possível evidenciar a influência da IL-3 sobre os parâmetros plaquetários.

Nos estudos *in vitro* a IL-3, o CSF-GM e a EPO mostraram ter ação estimulatória sobre a atividade trombopoética (Debili et al., 1993). Akan et al. (2000) mostraram que os níveis séricos de EPO podem explicar o mecanismo da trombocitose reativa na anemia por deficiência de ferro, devido à similaridade com a estrutura molecular da TPO. Concomitante às elevações da IL-6 e IL-3, observamos que os níveis séricos elevados de TPO nas diferentes fases das SF, mas aparentemente sem influência sobre o comportamento das PRs.

A HU é utilizada no tratamento da doença falciforme, principalmente com o objetivo de diminuir a ocorrência das CVO. Em um estudo randômico com 299 pacientes, foi possível observar uma queda significativa no número médio de crises (de 4.5 para 2.5 por ano), comparando o uso da HU à administração de placebo (Charache et al.,1995). Porém, a HU é uma droga mielosupressiva com ação sobre a hematopoiese, onde pode reduzir a atividade trombopoética (EL-Hazmi et al, 1995). No presente estudo, embora não tenha sido observada diferença entre os resultados nos grupos com e sem HU, os dados devem ser analisados com cautela e novos estudos, com maior número de pacientes e com critérios bem definidos como dosagem da droga e tempo de administração, poderão elucidar melhor o papel da HU sobre a trombopoiese e, mais especificamente, sobre as PRs.

7- CONCLUSÕES

- O elevado número de PRs acompanhado do alto grau de ativação dessas plaquetas sugerem que as PRs contribuem para a instalação e manutenção do processo vaso-oclusivo em pacientes com SF.
- Os elevados níveis séricos das interleucinas 3 e 6 provavelmente indicam a participação das mesmas no processo inflamatório que acompanha os fenômenos de vaso-oclusão, embora, aparentemente esses moduladores inflamatórios não exerçam efeito sobre a trombopoiese em pacientes com SF.
- Estudos posteriores analisando prospectivamente as PRs na evolução clínica de pacientes com SF, poderão fornecer novas contribuições ao entendimento da participação das plaquetas nas diversas fases da doença e da possível utilização das contagens das PRs como indicadoras da presença ou intensidade dos processos vaso-oclusivos.

8- ARTIGO

**EVALUATION OF RETICULATED PLATELETS IN PATIENTS
WITH SICKLE CELL DISEASES**

SUBMETIDO À: *THROMBOSIS RESEARCH*; ISSN: 0049-3848

**EVALUATION OF RETICULATED PLATELETS IN PATIENTS
WITH SICKLE CELL DISEASES**

J.F.A. Noronha^{a,*}, F.F Costa^b, S.T.O. Saad^b, I.G.H. Lorand-Metze^b, H.Z.W. Grotto^a.

^aDepartment of Clinical Pathology, School of Medical Sciences, State University of Campinas, Campinas-Brazil;

^bHemotherapy and Hematology Center, State University of Campinas, Campinas-Brazil.

***Correspondence to:**

José Fernando de Almeida Noronha

Departamento de Patologia Clínica

Faculdade de Ciências Médicas/UNICAMP

Caixa Postal 6111

CEP: 13083-970

Campinas-São Paulo-Brazil

Email: fnoronha@fcm.unicamp.br

ABSTRACT

Background and purpose: Reticulated platelet (RP) count provides an estimate of thrombopoiesis. The objective was to evaluate RP in patients in different stages of SCD and to determine the relationship between interleukin-6 (IL-6), interleukin-3 (IL-3) and thrombopoietin (TPO) and RP count and degree of activation.

Methods: Eighty-nine adult patients with SCD were studied: 38 were in the steady state, 27 in hemolytic crisis (HC) and 24 in vaso-occlusive crisis (VOC). RPs and activated platelets were analyzed by flow cytometry. Soluble P-selectin, IL-6, IL-3 and thrombopoietin (TPO) levels were measured by ELISA tests.

Results: The patients in VOC had a higher absolute number of RPs and CD62P+ platelets than did the control group or patients in the steady state. A significant correlation was observed between the absolute number of CD62P+ platelets and RPs in patients in the steady state, HC and VOC. In the steady-state group of patients, the level of soluble P-selectin was found to be dependent on the RP values. IL-3 and TPO serum levels were higher in patients in the steady state, HC and VOC than in the control group. IL-6 serum levels were higher in HC and VOC patients than in the control group and higher in patients in the steady state than in the VOC group.

Conclusion: Our results suggest that PRs contribute to the vaso-occlusive process in sickle cell disease. Increased interleukin serum levels probably indicate that inflammatory process is involved in the vascular-occlusive phenomenon. However, it appears that these inflammatory mediators do not have an effect on thrombopoiesis in sickle-cell-disease patients.

KEYWORDS: reticulated platelet, sickle cell disease, platelet activation, cytokines, selectin, inflammation, hemoglobinopathy.

ABBREVIATIONS

BSA	bovine serum albumin
CBC	complete blood count
CD41a	gpIIb/IIIa
CD62p	P-selectin
CD62p+	activated platelet
CG	control group
DC	direct current
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
Fig.	figure
FSC	forward scatter
HbSβ	S β thalassemia
HbS	hemoglobin S
HbSC	SC hemoglobinopathy
HbSS	sickle cell anemia
HC	hemolytic crisis
HFR	high fluorescence rate
HU	hydroxyurea
IL-3	interleukine 3
IL-6	interleukine 6
IRF	immature reticulocyte fraction
LFR	low fluorescence rate
MFR	medium fluorescence rate
MIF	mean intensity of fluorescence

MIF-CD62p+(RP)	mean intensity fluorescence of activated and reticulated platelets
PBS	phosphate-buffered saline
PE	phycoerythrin
PECy5	Cychrome
P-LCR	platelet large cell ratio
PLT	platelet count
PMN	polymorphonuclear
PRP	platelet-rich plasma
RP	Reticulated Platelet
SAS	Statistical Analysis System
SCD	sickle cell disease
sCD62p	soluble P-selectin
SSC	side scatter
TO⁻	mature platelet
TO	thiazole orange
TO⁺/CD62p+	reticulated and activated platelets
TO+	reticulated platelet
TPO	thrombopoietin
VOC	vaso-occlusive crisis

INTRODUCTION

Sickle cell anemia (Hb SS) is the result of a homozygous mutation involving a single base in the β -globin gene and results in myriad clinical manifestations caused by polymerization of hemoglobin S (HbS). Patients with compound heterozygosity for hemoglobin S and hemoglobin C (HbSC) can have similar, although not identical, complications. Patients with HbSS and HbSC, as well as those heterozygous for HbS and β -thalassemia (Hb S β), are referred to as having sickle cell disease (SCD) [1,2]. The polymerization of deoxygenated hemoglobin S (HbS), causing erythrocyte deformation, rigidity and fragility, is considered the basic physiopathological mechanism of SCD and leads to hemolytic anemia, vaso-occlusive crisis (VOC) and progressive functional asplenia. Additional factors such as inflammation, the number of polymorphonuclear (PMN) leukocytes in the circulatory system, endothelial activation, and abnormal adhesion of leukocytes, erythrocytes and platelets to the endothelium play a significant role in determining the severity of vaso-occlusive phenomena (pain episodes) [3]. In addition, pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines play an important role in painful crisis [4]. Treatment using hydroxyurea (HU) has been found to decrease the risk of VOC events in SCD, a potential clinical benefit that is most likely related to decreased HbS polymerization as a result of higher fetal Hb levels induced by the drug [5].

Thrombogenesis has been implicated in the development of SCD pain episodes on the basis of clinical and pathological observations. A number of studies have demonstrated that platelet count and volume in the steady state and in pain episodes are distinct [6,7]. Other investigators have reported that patients with SCD have increased platelet activation as a result of the expression and secretion of the α -granule membrane glycoprotein P-selectin (CD62p) on platelet surfaces [8].

Analogous to erythroid cells, platelets recently released from bone marrow contain small amounts of mRNA and retain the ability to synthesize small amounts of major membrane and alpha-granule proteins. These platelets are called reticulated platelets (RP) and were first described in 1969 by Ingram and Coopersmith [9]. Measurement of the percentage of RPs (%RP) in humans has the potential to be a useful marker of increased

platelet production and/or turnover. Experiments using platelet-rich plasma have shown that the %RP may increase when thrombopoiesis is increased and may be normal or decreased when platelet production is suppressed [10].

We therefore evaluated thrombopoietic activity in sicklers in the steady state and in SCD pain episodes by determining the number of RPs in peripheral blood, comparing RP activation with that of mature platelets and determining the influence of pro-inflammatory cytokines, soluble selectin and thrombopoietin

MATERIALS AND METHODS

This study was conducted at the Hematology and Blood Transfusion Center and Department of Clinical Pathology of the University of Campinas, Brazil. Before the study started, patients signed an institutional review board-approved informed consent.

Eighty-nine adult SCD patients (54 HbSS, 19 HbSC and 16 HbS β) in the steady state (no acute complications) (n=38), in VOC (n= 27) and in HC (n= 24) were studied (Table 1). In all the patients, previous diagnoses of SCD were documented and the groups were divided into steady-state and crisis groups according to clinical criteria.

Patients with suspected infection, acute chest syndrome, renal insufficiency or stroke were excluded, as were those that had had a blood transfusion up to 20 days before blood collection.

Thirty healthy individuals (21-50 years old, mean=33 years) without any clinical or laboratory records of anemia or infection/ inflammatory diseases were selected as the control group (CG)

Complete blood count (CBC), reticulocyte and platelet measurements

Blood samples were analyzed after blood collection in vacutainer tubes using K₃EDTA as anticoagulant (BD Vacutainer, São Paulo, Brazil), and all the samples were processed within 20 min of venesection.

CBC, platelet count (PLT), platelet large cell ratio (P-LCR) and immature reticulocyte fraction (IRF) were determined using the Sysmex XE-2100 automated hematology analyzer (Sysmex Corporation, Kobe, Japan). PLT was obtained by direct current (DC), which classifies the cells according to cell size. P-LCR is calculated as the ratio of the number of particles detected by DC between the 12 fl fixed discriminator and the upper discriminator to the number of particles between a lower and an upper discriminator. The result is expressed as a percentage and an absolute value (P-LCR) (#). Reticulocyte analysis was based on fluoro-flow cytometry and red semiconductor laser technologies. RNA content was analyzed by a patented fluorescent dye with polymethine, a membrane-permeable basic dye that binds to RNA. The distribution cytogram separates red blood cells and three different reticulocyte maturity classes according to RNA content: low fluorescence rate (LFR), medium fluorescence rate (MFR) and high fluorescence rate (HFR). IRF is obtained by means of the calculation MFR+HFR.

Preparation of platelets

All blood samples were collected in vacutainer tubes using 3.2% sodium citrate as anticoagulant (Grenher Vacuette, São Paulo, Brazil) and were processed within 20 minutes of venesection. Platelet-rich plasma (PRP) was obtained by centrifugation of the whole blood at 100 g for 10 min at room temperature. Then, 3 μ L of PRP were washed with phosphate-buffered saline (PBS, pH=7.2) containing bovine serum albumin (BSA) and fixed with 1% paraformaldehyde at 4°C for 15 min. After fixation, platelets were washed with PBS+BSA and labeled.

Labeling Platelets

The platelets were labeled with Cychrome-conjugated (PECy5) anti-gpIIb/IIIa (CD41a (Caltag, USA)) and phycoerythrin-conjugated (PE) anti-selectin P (CD62p, Caltag, USA). After 30 min the platelets were incubated with thiazole orange (TO) (Retic-COUNT; Becton Dickinson Immunocytometry Systems, CA, USA) at room temperature in the dark for 60 min for RNA labeling. Ten thousand events were analyzed by flow cytometry in FACScalibur equipment (Becton Dickinson, CA, USA) using Cell Quest software [11,12].

Activated Platelet, RP and activated RP count

The platelets were selected using forward-scatter and side-scatter gates in logarithmic amplification and by fluorescence (670 nm). Forward scatter (FSC) is a measure of cell size, and side scatter (SSC) is related to the internal structure of the particle. The platelet population was considered to be the population of CD41a-positive events in the cytogram. Platelets selected using this procedure were read at 575 nm for CD62p fluorescence (CD62p-positive= activated platelets) and 525 nm for TO fluorescence (TO-positive= RP). Activated RPs were positive for both labels (CD62p and TO).

Activated platelet, RP and activated RP values were expressed as percentages and absolute numbers. In addition, the mean CD62p-positive and TO-positive intensities of fluorescence (MIF) represent the intensity of expression of CD62p and the amount of RNA in the platelets. MIF values were given according to the logarithmic amplification scale on the cytograms.

Measurement of serum-soluble P-selectin, thrombopoietin (TPO), interleukin-6 (IL-6) and interleukin-3 (IL-3)

Soluble P-selectin, TPO, IL-6 and IL-3 serum levels were measured using commercially available enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kits (R&D Systems, Inc., Minneapolis, MN, USA).

Statistical Analysis

The Kruskal-Wallis test was used to compare groups. Spearman's rank correlation was used in the correlation analyses. The data are presented as the median and range. The level of statistical significance was set at 5% (P-value < 0.05) for all the analyses.

All calculations were performed using the Statistical Analysis System (SAS) for Windows, version 6.1 2 (SAS Institute Inc, 1989-1996, NC, USA).

RESULTS

1- Platelet analysis

Table 2 summarizes our results and shows that thrombocytosis was present both in the steady state and during SCD crisis. The percentage of macroplatelets quantified by P-LCR (%) was smaller in patients in HC than in the control group, but in absolute number P-LCR was higher in SCD patients than in the control group. P-LCR (#) was significantly higher in the VOC group than in HC or steady-state patients (Table 3 and Figure 1A). The number of activated platelets (CD62p⁺) was higher in all patient groups than in the control group and more elevated in the VOC group than in the steady-state group (Table 3 and Figure 1B).

The number of RPs was significantly higher in the SCD groups than in the control group. VOC patients had more elevated RP values than did HC patients. RP activation was higher in the SCD groups than in the control group, but there was no difference between SCD groups (Table 3 and Figure 1C).

When patients in the steady state were separated according to their hemoglobinopathy group, analysis of the intensity of RP activation showed that MIF was highest in HbSS patients, followed by HbSC and then HbS β patients (Figure 2).

RPs showed greater intensity of activation than did mature platelets in the control, steady-state, HC and VOC groups ($p < 0.00001$) (Figure 3).

Soluble P-selectin levels were higher in the VOC group than in the control group. However, there was no difference between SCD groups, between steady-state and control groups or between HC and control groups (Table 3).

RPs appear to contribute to activation of platelet populations, as a moderate correlation was observed between CD62p⁺ (#) and RP (#) in all stages of SCD ($r = 0.574$, $p = 0.0065$ for steady state; $r = 0.556$, $p = 0.0088$ for HC; and $r = 0.664$, $p = 0.0019$ for VOC). The possible influence of soluble P-selectin on RP number was tested, but a correlation was only observed in the steady state ($r = 0.771$, $p = 0.0001$). There was no correlation between RP and P-LCR.

2- Interleukin, TPO and IRF analyses

Serum IL-6 levels were significantly higher in the HC and VOC groups than in the steady-state or control groups (Table 4 and Figure 4A). SCD patients had higher IL-3 levels than did the control group, but there was no difference in IL-3 levels between patient groups (Table 4 and Figure 4B). TPO and IRF analysis yielded similar results (Table 4 and Figures 4C and 4D).

When patients undergoing HU treatment were separated from patients to whom no drugs were being administered, no difference was observed between the groups for any of the parameters studied.

DISCUSSION

In our study, the participation of platelets in the physiopathology of sickle cell syndromes was evaluated by different parameters. An increase in P-LCR values indicates an increased number of circulating macroplatelets in all patients groups and was more evident in the VOC patients. Variability in platelet size has been considered a sign of bone marrow proliferative stress in SCD, and high values of platelet distribution width (PDW) have been observed in VOC patients [8]. In addition, functional asplenia in SCD impairs withdrawal of old or damaged cells, extending the time for which the platelets are in circulation. Consequently, the platelet population is heterogeneous, with macroplatelets, normal-size platelets and small platelets, the latter of which have been described as circulating platelet microparticles (PMPs) [13,1]. Functional asplenia is probably related to the presence of platelets of different ages in the circulation system and is consequently an important cause of thrombocytosis in SCD patients, although other factors can also affect platelet behavior. It is known that high platelet consumption, particularly in VOC, promotes an increase in thrombopoietic activity with subsequent thrombocytosis in association with high plasmatic levels of the products secreted by platelets [6].

Studies of platelet activation in SCD patients have shown a decrease in aggregation to ADP and epinephrine *in vitro* during the steady state and an increase in platelet aggregation in patients with VOC. The lower aggregation response in the steady

state was interpreted as indicative of the partially degranulated platelets in circulation in steady-state patients [1]. Another study showed that the combination of elevated platelet count, lower platelet volume and lower intracellular P-selectin in SCD patients may constitute a physiological phenomenon that is unrelated to the vaso-occlusive process or thrombotic state [14]. P-selectin is a mediator of sickle erythrocyte adhesion in the vaso-occlusive process [15], and the activation and adhesion of platelets can mobilize P-selectin from α -granules, increasing the serum levels of sCD62p [14]. Studies have shown high sCD62p levels in patients with SCD [16,6] Our results showed higher activation of platelets in SCD patients than in CG patients and elevated sCD62p levels, specially during VOC. Thus, our data suggest that CD62p⁺ platelets contribute to thrombogenesis in VOC through the expression and exclusion of the adhesion mediator, which acts between blood cells and the vascular endothelium.

The participation of RPs in different processes, such as cardioembolic stroke, where there is an increase in %RP as a result of repetitive platelet activation and increased platelet turnover has been described [17]. Qualitative platelet dysfunction has been observed in dialysis patients compared with normal controls, suggesting increased platelet turnover after repetitive platelet activation and concomitant “platelet refractoriness” induced by the interaction of platelets with dialysis membranes [18]. In our study, the increase in the absolute RP number in patients with SCD and the significant correlation between CD62p⁺ platelets and RP count in all groups can be explained by an accelerated platelet turnover because of the high platelet activation and consumption observed mainly during VOC. In addition, these immature platelets showed a high degree of activation. Contrary to what was expected, there was no correlation between the number of RPs and the P-LCR, although both had increased. Surprisingly, the correlation between PRs (#) and sCD62p was only observed in the steady state. This finding was difficult to interpret, as sCD62p serum level is regulated by the activation and adhesion processes and, according to our results, the degree of activation was lower in the steady state than in VOC [14].

It appears that RP is involved with the vaso-occlusive process in SCD, and this participation is more evident in HbSS and HbSC patients than in HbS β patients, even in the steady state. Thus, the high degree of sickle hemoglobin polymerization and

sickling of red blood cells in HbSS individuals is aggravated by the presence of RP and increases the risk of a vaso-occlusive process and thrombotic events.

Several studies have shown increased levels of cytokines in serum even during the steady state of SCD. It is believed that there are significant subclinical microvascular occlusions in the steady state due to ongoing local tissue ischemia with necrosis. These subclinical micro-infarctions are induced by the enhanced adhesiveness of sickle erythrocytes to the vascular endothelium, along with the associated chronic endothelial activation and injury, and by production of pro-inflammatory cytokines (IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF- α) by activated endothelial cells [19,20,21,4]. In the vaso-occlusive process, cytokines such as IL-6 and TNF- α are released and stimulate the production of acute-phase proteins (e.g. "C" Reactive Protein) by the liver to minimize tissue damage caused by the microvascular infarctions [22]. Pathare et al. (2004) showed that IL-6 serum levels were significantly higher in steady-state and SCD patients in crisis than in normal controls and significantly higher in SCD patients in crisis than in steady-state patients [4]. Our results confirmed earlier findings and suggest that elevated IL-6 serum levels are more evident during HC and VOC, probably due to higher inflammatory activity in these clinical situations. However, platelet parameters were not influenced by IL-6 levels.

IL-3 is a multilineage stimulator that, in association with other growth factors, interacts with erythropoietin (EPO) and stimulates primitive erythroid stem cells ([23]). Our data showed high IL-3 serum levels in SCD patients, which are probably related to the inflammatory reaction common to the different phases of SCD. However, no evidence of any influence of IL-3 on thrombocytopoiesis was found.

As observed for IL-6 and IL-3, TPO serum levels also increased in SCD patients in different clinical conditions but without any apparent effect on platelet behavior.

HU is a myelosuppressive drug that affects hematopoiesis by reducing thrombopoietic activity [24,25]. In the present study, when groups undergoing HU treatment were compared with those that were not, no differences in platelet and interleukin parameters were observed. However, the data should be analyzed with caution, and further studies with a larger number of patients and well-defined criteria are required to elucidate the effect of HU on RPs and its role in thrombopoiesis.

In conclusion, the high number of RPs and high degree of activation found in our study suggest that RPs contribute to the establishment and maintenance of the vaso-occlusive process in patients with SCD. The high IL-3 and IL-6 serum levels probably indicate the presence of inflammatory processes that accompany the vaso-occlusive phenomenon. Nevertheless, these inflammatory modulators appear not to have an effect on thrombopoiesis in patients with SCD.

Acknowledgments

We acknowledge the Markers Cells Laboratory of the Hematology and Blood Transfusion Center of the University of Campinas, Brazil, for helpful platelet analysis. We are grateful to funding of the FAPESP and Dr Fernando Ferreira Costa for consent to the our participation in his thematic project on haemoglobinopathies. We also thank the Dr Ronei Mamoni to give advice and assistance with the method of ELISA..

REFERENCES

- [1] Wun T, Paglieroni T, Tablin F, Welborn J, Nelson K, Cheung A. Platelet activation and platelet-erythrocyte aggregates in patients cell anemia. *J Lab Clin Med* 1997; 129(5): 507-16.
- [2] Francis RB, Johnson CS. Vascular occlusion in sickle cell disease: current concepts and unanswered questions. *Blood* 1991; 77: 1405-14. 6-Tomer A, Harker LA, Kasey S, Eckman JR. Thrombogenesis in sickle cell disease. *J Lab Clin Med* 2001; 137: 398-407.
- [3] Covas DT, Ângulo IL, Palma PVB, Zago MA. Effects of hydroxyurea on the membrane of erythrocytes and platelets in sickle cell anemia. *Haematologica* 2004; 89: 273-80.
- [4] Pathare A, Kindi AS, Alvaqdy AA, Daar S, Knox-Macaulay H, Dennison D. Cytokine profile of sickle cell disease in Oman. *Am J Hematol* 2004; 77: 323-8.
- [5] Tavakkoli F, Nahavandi M, Wyche MQ, Castro O. Effects of Hydroxyurea treatment on cerebral oxygenation in adult patients with sickle cell disease: an open-label pilot study. *Clin Therap* 2005; 27:1083-8.
- [6] Tomer A, Harker LA, Kasey S, Eckman JR. Thrombogenesis in sickle cell disease. *J Lab Clin Med* 2001; 137: 398-407.
- [7] Bessman TD, Gilmar PR, Gardner FH. Use of mean platelet volume improves detection of platelet disorders. *Blood Cells* 1985; 11:127-35.
- [8] Amin MA, Amin AP, Kulkarni HR. Platelet distribution width (PDW) is increase in vaso-occlusive crisis in sickle cell disease. *Ann Hematol* 2004; 83: 331-5.
- [9] Ingram M, Coopersmith G. Reticulated Platelet following acute blood loss. *Br J Haematol* 1969; 17: 225-8.
- [10] McCabe DJH, Harrison P, Sidhu PS, Brown MM, Machin SJ. Circulating reticulated platelets in the early an late phase after ischaemic stroke and transient ischaemic attack. *Br J Haematol* 2004; 126: 861-9.

- [11] Balduini CL, Noris P, Spedini P, Belletti S, Zambelli A, Da Prada GA. Relationship between size and thiazole orange fluorescence of platelets in patients undergoing high-dose chemotherapy. *Br J Haematol* 1999; 106(1): 202-7.
- [12] Rinder HM. Platelet function testing by flow cytometry. *Clin Lab Sci* 1998; 11(6): 365-72.
- [13] Erslev AJ. Hypersplenism and Hyposplenism. In: Beutler E, Lichtman MA, Coller BS, Kipps TJ, Seligsohn U. editors. *Williams Hematology*. New York: Mc Graw Hill; 2001. p.683-703
- [14] Mohan JS, Lip GYH, Bareford D, Blann AD. Platelet P-selectin and platelet mass, volume and component in sickle cell disease. Relationship to genotype. *Thromb Res* 2006; 117: 623-9.
- [15] Blann AD, Marwah S, Serjeant G, Bareford D, Wright J. Platelet activation and endothelial cell dysfunction in sickle cell disease is unrelated to reduced antioxidant capacity. *Blood Coag Fibrinol* 2003; 14: 255-9.
- [16] Wagner MC, Eckman JR, Wick TM. Histamine increases sickle erythrocyte adherence to endothelium. *Br J Haematol* 2005; 132: 512-522.
- [17] Nakamura T, Uchiyama S, Yamazaki M, Okubo K, Takahawa Y, Iwata M. Flow cytometric analysis of reticulated platelets in patients with ischemic stroke. *Thromb Res* 2002; 106: 171-6.
- [18] Himmelfarb J, Holbrook D, Ellen M, Ault K. Increased reticulated platelets in dialysis patients. *Kid Inter* 1997; 51: 834-923
- [19] Hebbel RP. Adhesive interactions of sickle erythrocytes with endothelium. *J Clin Invest* 1997; 99: 2561-71.
- [20] Hebbel RP, Vercellotti GM. The endothelial biology of sickle cell disease. *J Lab Clin Med* 1997; 129(3): 288-93.

- [21] Hebbel RP. Blockade of adhesion of sickle cells to endothelium by monoclonal antibodies. *N Engl J Med Rev* 2000; 342:1910-2.
- [22] Baumann H, Gauldie J. The acute phase response. *Immunol Today* 1994; 15: 74-80.
- [23] Quesenberry PJ, Colvin GA. Hematopoietic stem cells, progenitor cells and cytokines. In: Beutler E, Lichman MA, Coller BS, Kipps TJ, Seligsohn U, editors. *Williams Hematology*. New York: Mc Graw Hill; 2001. p.153-174.
- [24] Charache S, Terrin ML, Moore RD, Dover GJ, Barton FB, Eckert SV, Memahon RP, Bonds DR. Effect of hydroxyurea on the frequency of painful crises in sickle cell anemia. Investigator of the Multicenter Study of Hydroxyurea in Sickle Cell Anemia. *N Engl J Med* 1995; 332: 1317-22.
- [25] El-Hazmi MAF, Al-Momen A, Warsy AS. The pharmacological manipulation of fetal haemoglobin. Trials using hydroxyurea and recombinant human erythropoietin. *Acta Haematol* 1995; 93: 57-61.

Table 1- Patient characteristics

SCD groups	Sex (M – F)	Age (years) Median (range)	Diagnosis	Treatment (HU)
Steady state (n=38)	11 - 27	31.5 (19-52)	HbSS = 11 HbSC= 14 HbSβ = 13	12
HC (n=27)	16 - 11	32.0 (16-54)	HbSS = 24 HbSC= 01 HbSβ = 02	04
VOC (n=24)	12 -12	31.5 (19-52)	HbSS = 19 HbSC= 04 HbSβ = 01	03

Table 2- Values of the parameters analyzed

Parameters	CG	steady state	HC	VOC
(Unit)	Median	Median	Median	Median
	(range)	(range)	(range)	(range)
PLT	236	443	371	491
(10 ⁹ /L)	(181 – 341)	(67 – 1030)	(228 – 765)	(293 – 739)
P-LCR	28	22.4	22.5	25,2
(%)	(13.6 – 37.9)	(16.4 – 31.7)	(12.8 – 48)	(8,8 – 40,9)
P-LCR	62.41	90.67	99.01	129.02
(10 ⁹ /L)	(36.48 – 98.89)	(17.55 – 203.35)	(38.14 – 223.68)	(60.28 – 211,10)
CD62p+	2,25	5.62	5.20	11.25
(10 ⁹ /L)	(1,12– 19,78)	(0.45– 44.91)	(2.20– 21.08)	(2.69– 53.47)
RP	2.08	4.86	3.12	7.94
(10 ⁹ /L)	(0.29 – 17.89)	(0.58- 16.27)	(0.60– 16,89)	(1,12– 19,78)
TO+/CD62p+	39.96	69.5	93.77	98.74
(10 ⁹ /L)	(15.78 – 113.48)	(8.85– 264.51)	(21.17– 296.98)	(14.82– 288.85)
IL-6	1.34	1.5	5.21	5.11
(pg/mL)	(0.74– 3.24)	(0.58– 9.62)	(0.5– 194.7)	(1.52– 404.5)
IL-3	0	21.1	23.5	23.5
(pg/mL)	(0– 116,4)	(0 – 72.4)	(0 – 1262.6)	(0 – 65.2)
TPO	172.23	206.2	264.5	236.0
(pg/mL)	(113.4 – 332)	(124.5 – 1524.1)	(122.9 – 662.7)	(107.1 – 756.0)
sCD62p	5.83	6.37	7.0	8.4
(ng/mL)	(2.39 – 22.2)	(3.34 – 18.2)	(3.52 – 14.0)	(3.89 – 22.7)
IRF	9.2	28.6	32.6	26.7
(%)	(2.5 – 16.4)	(17.2 – 53.8)	(20.4 – 53.7)	(6.3 – 50.5)

Table 3- Platelet parameters: statistical differences among the groups studied. P -value

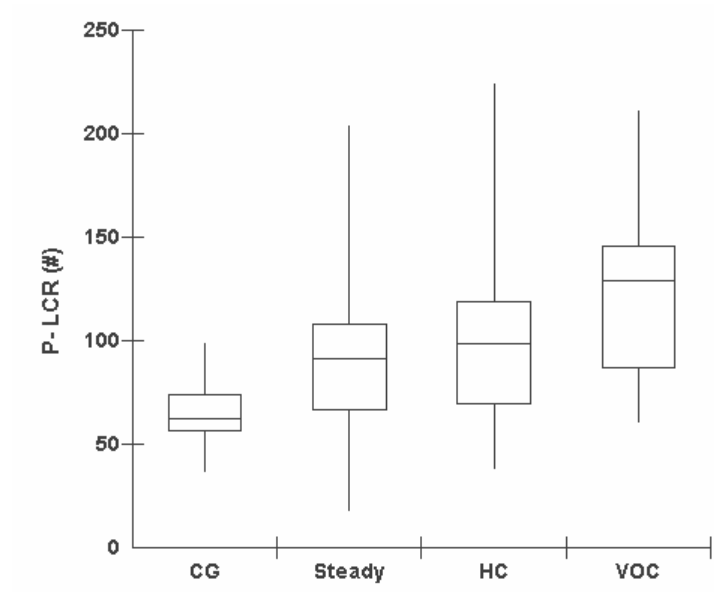
Groups	sCD62P	P-LCR (%)	P-LCR (#)	CD62P ⁺ (#)	RP (#)	TO ⁺ /CD62P ⁺ (#)
CG versus steady	0.3838	0.0003	0.0005	0.0007	0.0230	0.0270
CG versus HC	0.1210	0.0512	0.0011	0.0001	<0.00001	0.0008
CG versus VOC	0.0482	0.1234	< 0.00001	0.0001	<0.00001	0.0002
steady versus HC	0.5314	0.4640	0.6083	0.3018	0.2015	0.5359
steady versus VOC	0.0686	0.1860	0.0060	0.0291	0.0122	0.2303
HC versus VOC	0.4616	0.7989	0.0362	0.1590	0.0494	0.4850

Table 4- Comparison of the groups in terms of the IL and TPO levels and %IRF. p - value

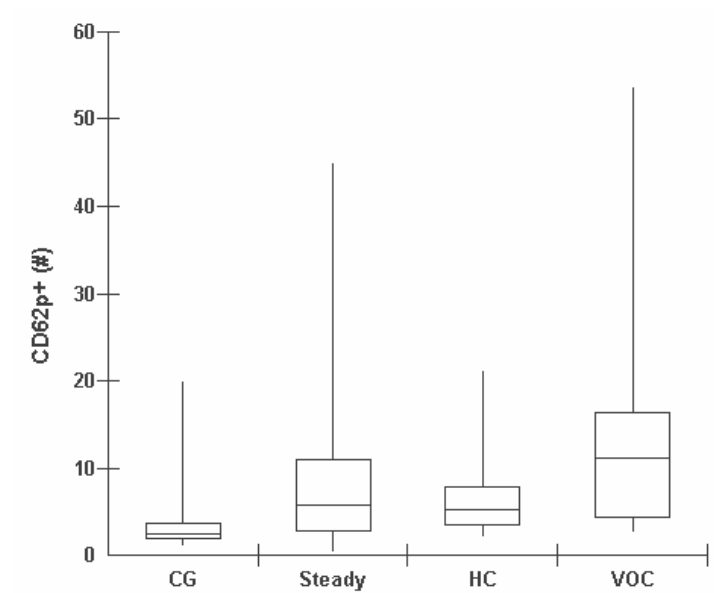
Groups	IL-6	IL-3	TPO	IRF%
CG versus steady	0.2965	0.0001	0.025	< 0.00001
CG versus HC	< 0.00001	0.0001	0.001	< 0.00001
CG versus VOC	< 0.00001	0.0003	0.003	< 0.00001
steady versus HC	< 0.00001	0.3528	0.4210	0.0378
steady versus VOC	< 0.00001	0.6282	0.4225	0.7125
HC versus VOC	0.6577	0.6059	0.9684	0.0761

Figure 1-

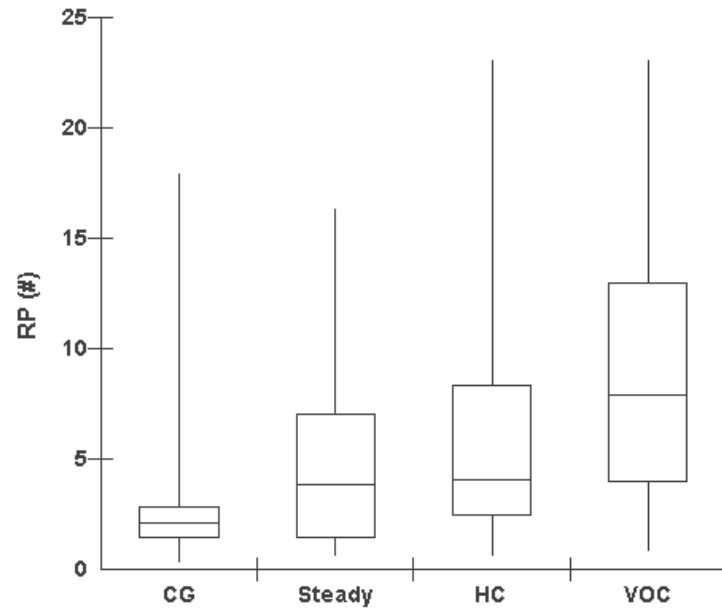
1A



1B



1C



1D

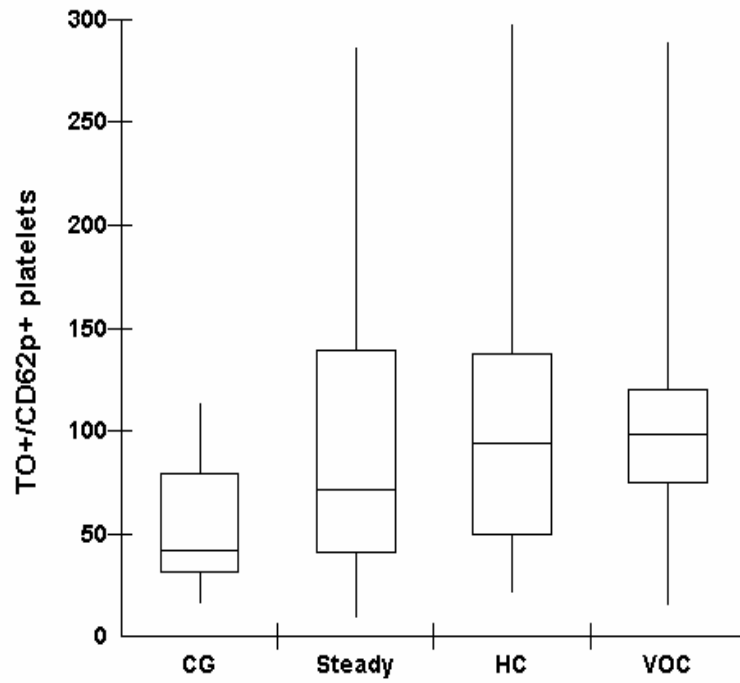


Figure 2-

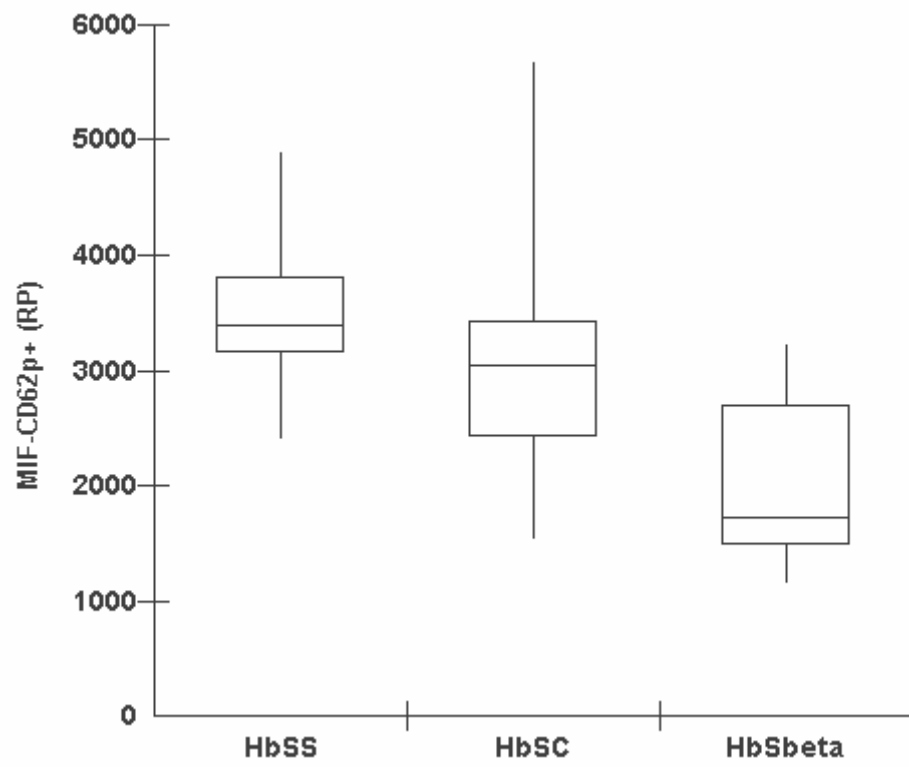


Figure 3-

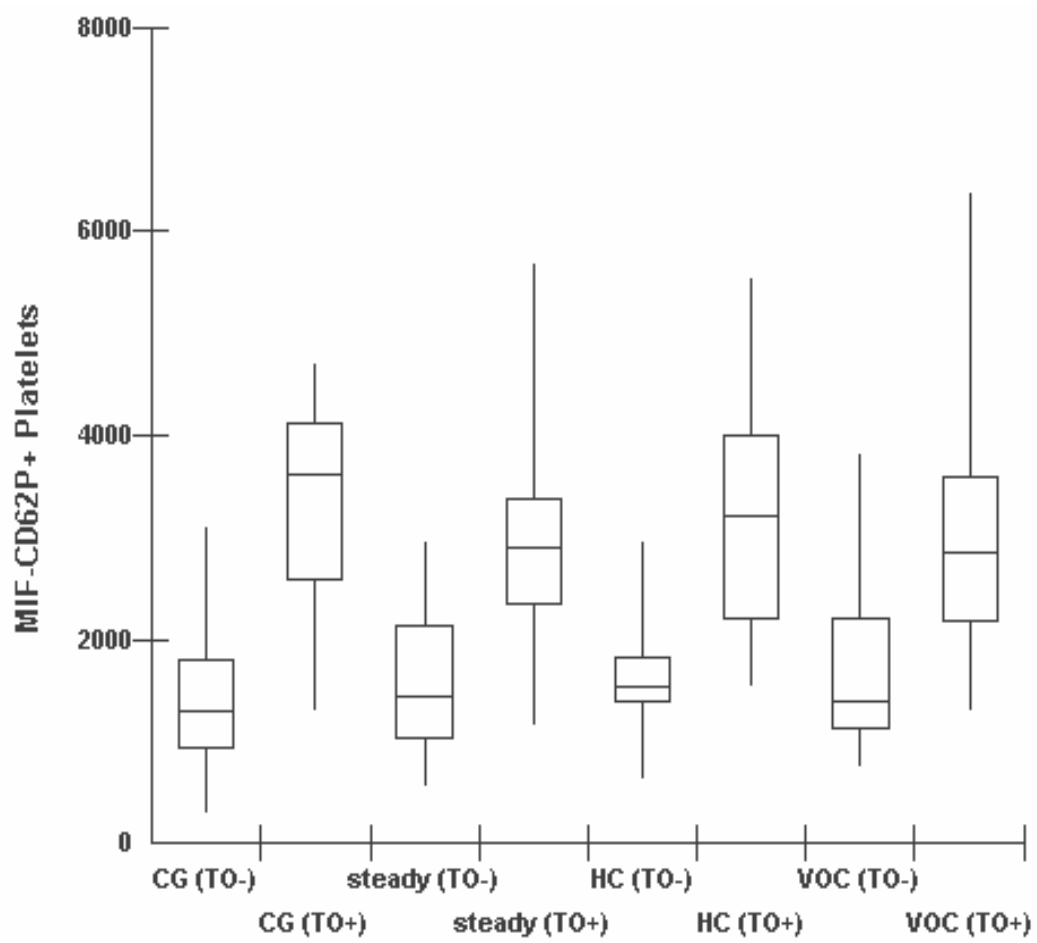
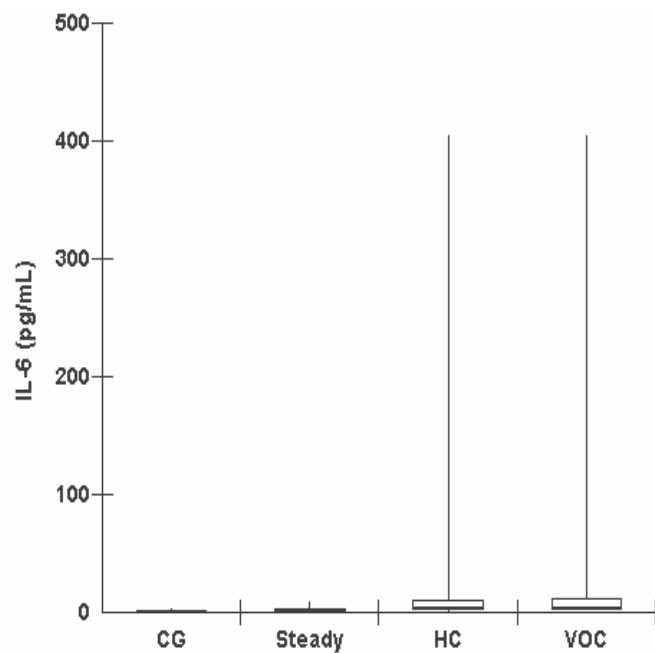
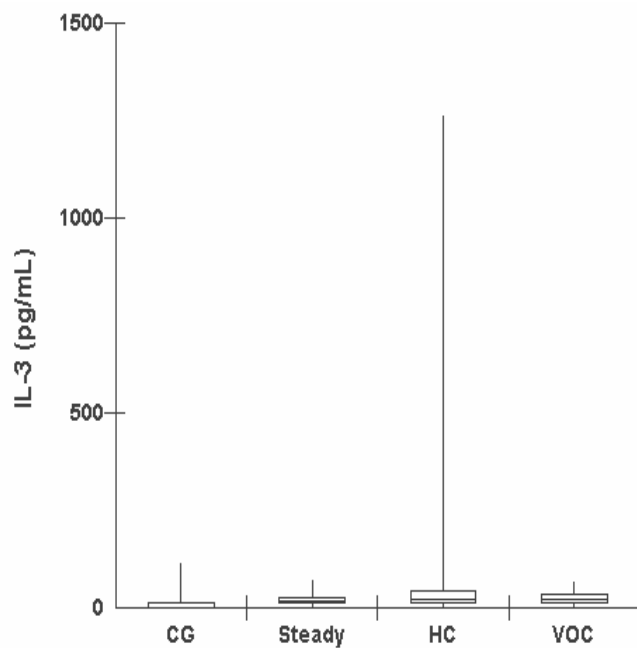


Figure 4-

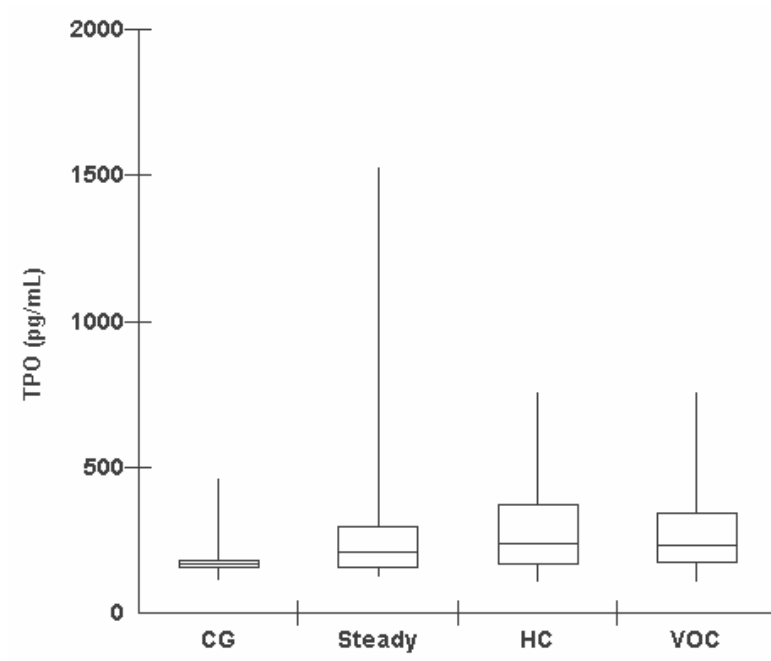
4A



4B



4C



4D

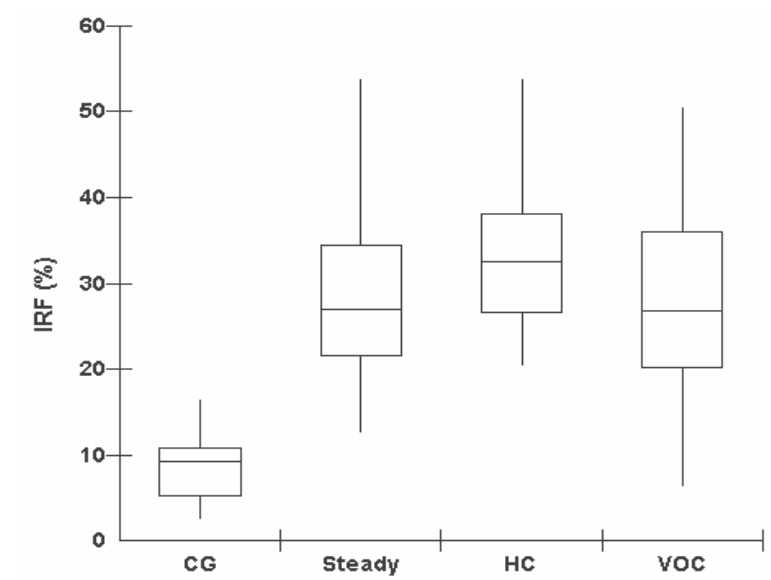


Table 1- HbS β : S β thalassemic; HbSS: sickle cell anaemia; HbSC: haemoglobinopathie SC; HU: hydroxyurea; CG: control group; HC: hemolytic crisis; VOC: vaso-occlusive crisis; M: male; F: female.

Table 2- PLT: platelet counting; P-LCR: platelet large-cell ratio; CD62p⁺: activated platelets; RP: reticulated platelets; TO⁺/CD62p⁺: activated and reticulated platelets; IL-6: interleukin 6; IL-3: interleukin 3; TPO: thrombopoietin; sCD62P: soluble P-selectin IRF: immature reticulocyte fraction; HC: hemolytic crisis; VOC: vaso-occlusive crisis; CG: control group.

Table 3- P-LCR: platelet large cell ratio; CD62p⁺ (#): absolute number of activated platelets; RP (#): absolute number of reticulated platelets; TO⁺/CD62p⁺ (#): absolute number of activated and reticulated platelets; sCD62P: soluble P-selectin; steady: SCD patients in steady state; HC: hemolytic crisis; VOC: vaso-occlusive crisis CG: control group; IRF: immature reticulocyte fraction.

Table 4- steady: SCD patients in steady state; HC: hemolytic crise; VOC: vaso-occlusive crise CG: control group; IRF: immature reticulocyte fraction; IL-6: interleukin 6; IL-3: interleukin 3; TPO: thrombopoietin.

Figure 1- Box-plot showing distribution of P-LCR (1A), CD62p⁺ platelets (1B), RP (1C) and TO+/CD62p⁺ (1D) in CG and SCD groups. The vertical lines indicate the range values. The boxes indicate quartile ranges and the horizontal lines indicate medians.

CG: control group; Steady: steady state; HC: hemolytic crisis; VOC: vaso-occlusive crisis; P-LCR (#): absolute number of platelet large cell ratio; CD62p⁺ (#): absolute number of activated platelets; RP (#): absolute number of reticulated platelets; TO+/CD62p⁺ platelets: absolute number of reticulated and activated platelets

Figure 2- Box -plot showing the intensity of expression of the activated and reticulated platelets in the steady state in different SCD. The vertical lines indicate the range values. The boxes indicate quartile ranges and the horizontal lines indicate medians.

MIF- CD62p⁺ (RP): mean intensity fluorescence of activated and reticulated platelets; HbSS: patients with sickle cell anemia; HbSC: patients with heterozygosity for hemoglobin S and hemoglobin C; HbSbeta: Sβ thalassemic patients.

Figure 3- Box-plot showing the statistical differences in the intensity of activation of the mature platelets and RP in the groups studied. The vertical lines indicate the range values. The boxes indicate quartile ranges and the horizontal lines indicate medians.

MIF- CD62p⁺ platelets: medium index fluorescence of activated platelets; steady (TO-): mature platelets of SCD patients in steady state; steady (TO+): reticulated platelets of SCD patients in steady state; HC (TO-): mature platelets of patients in hemolytic crisis; HC (TO+): reticulated platelets of patients in hemolytic crisis VOC (TO-): mature platelets of patients in vaso-occlusive crisis; VOC (TO+): reticulated platelets of patients in vaso-occlusive crisis; CG (TO-):mature platelets of control group; CG (TO+):mature platelets of control group.

Figure 4- Box-plot showing distribution of IL-6 (4A), IL-3 (4B), TPO (4C) and IRF (4D) in CG and SCD groups. The vertical lines indicate the range values. The boxes indicate quartile ranges and the horizontal lines indicate medians.

CG: control group; Steady: steady state; HC: hemolytic crisis; VOC: vaso-occlusive crisis; IL-6: interleukin 6; IL-3: interleukin 3; TPO: thrombopoietin; IRF: immature reticulocyte fraction.

9- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abrams C, Shattil SJ. Immunological detection of activated platelets in clinical disorders. *Thromb Haemost* 1991;65: 467-73.

Akan H, Güven N, Aydogdu I, et al. Thrombopoietic cytokines in patients with iron deficiency anemia with or without thrombocytosis. *Acta Haematol* 2000; 103:152-6.

Amin MA, Amin AP, Kulkarni HR. Platelet distribution width (PDW) is increase in vaso-occlusive crisis in sickle cell disease. *Ann Hematol* 2004; 83: 331-5.

Ault KA, Rinder HM, Mitchell JG. The significance of platelets with increased RNA content (reticulated platelets): a measure of the rate of thrombopoiesis. *Am J Clin Pathol* 1992; 98: 637-43.

Balduini CL, Noris P, Spedini P, Belletti S, Zambelli A, Da Prada GA. Relationship between size and thiazole orange fluorescence of platelets in patients undergoing high-dose chemotherapy. *Br J Haematol* 1999; 106(1): 202-7.

Ballem PJ, Belzberg A, Devine DV, et al. Kinetic studies of the mechanism of thrombocytopenia in patients with human immunodeficiency virus infection. *N Engl J Med* 1992; 327: 1779-84.

Basser RL, Rasko JE, Clarke K, Cebon J, Green MD, Hussein S, Alt C, Menchaca D, Tomita D, Marty J, Fox RM, Begley CG. Thrombopoietic effects of pegylated recombinant human megakaryocyte growth and development factor (PEG-rHuMGDF) in patients with advanced cancer. *Lancet* 1996; 348: 1279-86.

Baumann H, Gauldie J. The acute phase response. *Immunol Today* 1994; 15: 74-80.

Bellucci S, Han ZC, Caen JP. Positive and negative regulation of megakaryocytopoiesis. *C R Seances Soc Biol Fil* 1996; 190: 515-9.

Beutler E. The sickle cell diseases and related disorders. In: Beutler E, Lichtman MA, Coller BS, Kipps TJ, Seligsohn U. *Williams Hematology: USA*; Mc Graw Hill. 2001. p.581-610.

Blann AD, Marwah S, Serjeant G, Bareford D, Wright J. Platelet activation and endothelial cell dysfunction in sickle cell disease is unrelated to reduced antioxidant capacity. *Blood Coag Fibrinolysis* 2003; 14: 255-9.

Blay JY, Favrot M, Rossi JF, Wijdenes J. Role of interleukin-6 in paraneoplastic thrombocytosis. *Blood* 1993; 82: 2261-2.

Carlino JA, Higley HR, Creson JR, Avis PD, Ogawa Y, Ellingsworth LR. Transforming growth factor beta 1 systemically modulates granuloid, erythroid, lymphoid, and thrombocytic cells in mice. *Exp Hematol* 1992; 20: 943-50

Cerutti A, Custodi P, Duranti M, Noris P, Balduini CL. Thrombopoietin levels in patients with primary and reactive thrombocytosis. *Br J Haematol* 1997; 99(2): 281-4.

Charache S, Terrin ML, Moore RD, Dover GJ, Barton FB, Eckert SV, Memahon RP, Bonds DR. Effect of hydroxyurea on the frequency of painful crises in sickle cell anemia. Investigator of the Multicenter Study of Hydroxyurea in Sickle Cell Anemia. *N Engl J Med* 1995; 332: 1317-22.

Choi ES, Nichol JL, Hokom MM, Hornkohl AC, Hunt P. Platelets generated *in vitro* from proplatelet-displaying human megakaryocytes are functional. *Blood* 1995; 85(2): 402-13.

Colman RW, Rao AK, Rubin RN. Factor XI deficiency and hemostasis. *Am J Hematol* 1994; 45(1): 73-8.

Dale GL, Friese P, Hynes LA, Burstein SA. Demonstration that thiazole-orange positive platelets in the dog less than 24 hours old. *Blood* 1995; 85(7): 1822-5.

Debili N, Masse J, Katz A, Guichard J, Breton-Gorius J, Vainchenker W. Effects of recombinant human hematopoietic growth factors interleukin-3, interleukin-6, stem cell factor and leukemia inhibitor factor on megakaryocytic differentiation of CD34+ cells. *Blood* 1993; 82: 84-95.

Delgado AV, Alexander SL, McManus AT, Pusateri AE. Antibodies against cell receptors, CD36, CD41a, and CD62P crossreact with porcine platelets. *Clin Cytometry* 2003; 56B: 62-7.

Doraby DJ, Thorne RF, Fecondo JV, Burns GF. Stimulation of platelet activation and aggregation by a carboxyl-terminal peptide from thrombospondin binding to the integrin associated protein receptor. *J Biol Chem* 1997; 272: 14740-7.

Dover GJ, Charache S. Hydroxiurea induction of fetal hemoglobin synthesis in sickle-cell disease. *Sem Oncol* 1992; 19:61-8.

El-Hazmi MAF, Al-Momen A, Warsy AS. The pharmacological manipulation of fetal haemoglobin. Trials using hydroxyurea and recombinant human erythropoietin. *Acta Haematol* 1995; 93: 57-61.

Embury SH, Hebbel RP, Steinberg MH e Mohandas N. Pathogenesis of vasoocclusion In: Embury SH, Hebbel RP, Steinberg MH, Mohandas N. *Sickle cell disease: basic principles and clinical practice*. New York; Raven Press 1994. p.311-42.

Erslev AJ. Hypersplenism and Hyposplenism. In: Beutler E, Lichtman MA, Coller BS, Kipps TJ, Seligsohn U. *Williams Hematology*. USA; Mc Graw Hill. 2001. p.683-703.

Francis RB, Johnson CS. Vascular occlusion in sickle cell disease: current concepts and unanswered questions. *Blood* 1991; 77: 1405-14.

Gisslinger H, Chott A, Scheithauer W, Gilly B, Linkesch W, Ludwig H. interferon in essential thrombocythaemia. *Br J Haematol* 1997; 97(2): 340-2.

Givan AL. *Flow Cytometry. First Principles*. New York: Ed. Wiley - Liss; 1992. p.9-122. v.1.

Grotto HZW, Noronha JFA. Platelet larger cell ratio (P-LCR) in patients with dyslipidemia. *Clin Lab Haem* 2004; 26: 347-9.

Harker LA, Finch CA. Thrombokinetics in man. *J Clin Invest* 1969; 48: 963-8,

Harker LA, Hanson SR, Kelly AB. Antithrombotic strategies targeting thrombin activities, thrombin receptors and thrombin generation. *Thromb Haemost* 1997; 78: 736-41.

Harrison P, Robinson MSC, Mackie IJ, Martchin SJ. Reticulated platelets. *Platelets* 1998; 8: 378-84.

Hebbel RP, Vercellotti GM. The endothelial biology of sickle cell disease. *J Lab Clin Med* 1997; 129(3): 288-93.

Hebbel RP. Adhesive interactions of sickle erythrocytes with endothelium. *J Clin Invest* 1997; 99: 2561-71.

Hebbel RP. Blockade of adhesion of sickle cells to endothelium by monoclonal antibodies. *N Engl J Med* 2000; 342:1910-2.

Himmelfarb J, Holbrook D, Ellen M, Ault K. Increased reticulated platelets in dialysis patients. *Kid Inter* 1997; 51: 834-9.

Hoffbrand AV, Pettit JE. Platelets, Blood Coagulation and Haemostasis. In: Hoffbrand AV, Pettit JE. *Essential Haematology*. London: Blackwell Science; 1993. p.94-p.120.

Hsu-Lin Sc, Berman CL, Furie BC, August D, Furie B. A platelet membrane protein expressed during platelet activation. *J Biol Chem* 1984; 259:9121-6.

Hynes RO. Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell* 1992; 69: 11-25.

Hynes RO. The impact of molecular biology on models for cell adhesion. *Bioessays Rev* 1994; 16(9): 663-9.

Ingram M, Coopersmith G. Reticulated Platelet following acute blood loss. *Br J Haematol* 1969; 17: 225-8.

Johnston GI, Cook RG, McEver RP. Cloning of GMP-140, a granule membrane protein of platelets and endothelium: sequence similarity to proteins involved in cell adhesion and inflammation. *Cell* 1989; 56: 1033-8.

Karpatkin S. Human platelet senescence. *Ann Rev Med* 1972; 23: 101-28.

Kaushansky K, Lin N, Grossmann A, Humes J, Sprugel KH, Broudy VC. Thrombopoietin expands erythroid, granulocyte-macrophage, and megakaryocytic progenitor cells in normal and myelossupressed mice. *Exp Hematol* 1996; 24: 265-9.

Kaye JA. FDA Licensure of NEUMEGA to prevent severe chemotherapy-induced thrombocytopenia. In: MJ Murphy, DJ Kuter. Thrombopoietin: From Molecule to Medicine. Miamisburg: AlphaMed Press; 1998. p. 207-29.

Kuter DJ. Megakaryopoieses and thrombopoiesis. In: Beutler E, Lichtman MA, Coller BS, Kipps TJ, Seligsohn U. Williams Hematology. USA: Mc Graw Hill; 2001.p.1339-55.

Landolfi R, Ciabattini G, Patrignani P, Castellana MA, Pogliani E, Bizzi B, Patrono C. Increased thromboxane biosynthesis in patients with polycythemia vera: Evidence for aspirin-suppressible platelet activation *in vivo*. Blood 1992; 80:1965-71.

Lee LG, Chen CH & Chiu LA. Thiazole orange, a new dye for reticulocyte analysis. Cytometry 1986; 7: 508-15.

Long MW, Dixit VM. Thrombospondin functions as a cytoadhesion molecule for human hematopoietic progenitor cells. Blood 1990; 75(12): 2311-8.

Lyra IM, Gonçalves MS, Braga JAP, Gesteira MF, Carvalho MH, Saad STO, Figueiredo MS, Costa FF. Clinical, hematological, and molecular characterization of sickle cell anemia pediatric patients from two cities in Brazil.. Cad. Saúde Pública. Rio de Janeiro, RJ. 2005 21(4): p1287-1290.

Malyszko J, Malyszko JS, Borawski J, Rydzewski A, Kalinowski M, Azzadin A, Mysliwiec M, Buczek W. A study of platelet functions, some hemostatic and fibrinolytic parameters in relation to serotonin in hemodialysed patients under erythropoietin therapy. Thromb Res 1995; 77: 133-8.

Matsui NM, Varki A, Embury SJ. Heparin inhibits the flow adhesion of sickle red blood cells to P-selectin. Blood 2002; 100(10): 3790-6.

McCabe DJH, Harrison P, Sidhu PS, Brown MM, Machin SJ. Circulating reticulated platelets in the early and late phase after ischaemic stroke and transient ischaemic attack. Br J Haematol 2004; 126: 861-9.

McCaughan G, Herkes R, Powers B, Rickard K, Gallagher ND, Thompson JF, Sheil AG. Thrombocytopenia post liver transplantation: correlations with pre-operative platelet count., blood transfusion requirements , allograft function and outcome. J Hepatol 1992; 16: 16-22.

McEver RP. Leukocyte interactions mediated by selectins. *Thromb Haemost Rev* 1991; 66(1): 80-7.

Michelson AD. Flow Cytometry: a clinical test of platelet function. *Blood* 1996; 87(12): 4925-36.

Mohan JS, Lip GYH, Bareford D, Blann AD. Platelet P-selectin and platelet mass, volume and component in sickle cell disease. Relationship to genotype. *Thromb Res* 2006; 117: 623-9.

Muraoka K, Tsuji K, Yoshida M, Ebihara Y, Yamada K, Sui X, Tanaka R, Nakahata T. Thrombopoietin-independent effect of interferon-gamma on the proliferation of human megakaryocyte progenitors. *Br J Haematol* 1997; 98: 265-73.

Nakahata T, Ogawa M. Hematopoietic colony-forming cells in umbilical cord blood with extensive capability to generate mono and multipotential hematopoietic progenitors. *J Clin Invest* 1982; 70(6): 1324-8.

Nakamura T, Uchiyama S, Yamazaki M, et al. Flow cytometric analysis of reticulated platelets in patients with ischemic stroke. *Thrombosis Research* 2002; 106: 171-6.

Nomura S, Ogami K, Kawamura K, et al. Cellular localization of thrombopoietin mRNA in the liver by in situ hybridization. *Exp Hematol* 1997; 25: 565-71.

Okpala I. The intriguing contribution of white blood cells to sickle cell disease-a red cell disorders. *Blood Rev* 2004; 18: 65-73.

Panzer S, Haubenstock A, Minar E. Platelets in hyperthyroidism: studies on platelet counts, mean platelet volume, 111-indium-labeled platelet kinetics, and platelet – associated immunoglobulins G and M. *J Clin Endocr Met* 1990; 70: 491-501.

Parise LV, Smyth SS, Coller BS. Platelet morphology, biochemistry, and function. In: Beutler E, Lichtman MA, Coller BS, Kipps TJ, Seligsohn U. *Williams Hematology*. USA:Mc Graw Hill; 2001. p.1357-408.

Pathare A, Kindi AS, Alvaqdy AA, Daar S, Knox-Macaulay H, Dennison D. Cytokine profile of sickle cell disease in Oman. *Am J Hematol* 2004; 77: 323-8.

Pathare A, Kindi AS, Daar K, Dennison D. Cytokines in sickle cell disease. *Hematology* 2003; 8: 329-337.

Reverter JC, Escolar G, Sanz C, Cases A, Villamor N, Nieuwenhuis NK, Lopez J, Ordinas A. Platelet activation during hemodialysis measured through exposure of P-selectin: Analysis by flow cytometric and ultrastructural techniques. *J Lab Clin Med* 1994; 124: 79-85.

Richards EM, Jestice HK, Madendra P, et al. Measurement of reticulated platelets following peripheral blood progenitor cell and bone marrow transplantation: implications for marrow reconstitution and use of thrombopoietin. *Bone Marrow Transpl* 1996; 17: 1029-36.

Rinder CS, Bonan JL, Rinder HM. Cardiopulmonary bypass induces leukocyte-platelet adhesion. *Blood* 1992; 79:1201-10.

Rinder HM, Munz UJ, Ault KA, Bonan JL, Smith BR. Reticulated platelets in the evaluation of thrombocytopenic disorders. *Arch Pathol Lab Med* 1993; 117(6): 606-10.

Rinder HM, tracey JL, Rinder CS, Leitenberg D, Smith BR. Neutrophil but not monocyte activation inhibits P-selectin-mediated platelet adhesion. *Thromb Haemost* 1994; 72(5): 750-6.

Rinder HM, Wang C, Smith BR. Thrombotic events in patients with thrombocytosis are associated with high absolute and relative reticulated platelets counts. *Blood* 1996; 88(1):169-73.

Rinder HM. Platelet function testing by flow cytometry. *Clin Lab Sci* 1998; 11(6): 365-72.

Robinson MSC, Harrison C, Mackie IJ. Reticulated platelets in primary and reactive thrombocytosis. *Br J Haematol* 1998; 101:388-95.

Rodrigues L. Costa FF, Saad STO, Grotto HZW. High levels of neopterin and interleukin-3 sickle cell disease patients. *J Clin Lab Anal* 2006; 20: 75-9.

Saxon BR, Mody M, Blanchette VS, Freedman J. Reticulated platelet counts in the assessment of thrombocytopenic disorders. *Acta Paediatr Suppl* 1998; 424:65-70.

Semple JW, Siminovitch KA, Mody M, Milev Y, Lazarus AH, Wright JF, freedman J. Flow cytometric analysis of platelets from children with Wiskott – Aldrich syndrome reveals defects in platelets development activation and structure. *Br J Haematol* 1997; 97: 747-54.

Shattil SJ, Cunningham M, Hoxie JA. Detection of activated platelets in whole blood using activation-dependent monoclonal antibodies and flow cytometry. *Blood* 1987; 70: 307-15.

Shiota G, Okubo M, Kawasaki H, Tahara T. Interferon increases serum thrombopoietin in patients with chronic hepatitis. *C Br J Haematol* 1997; 97:340-2.

Sixma JJ, de Groot PG. Regulation of platelet adhesion to the vessel wall. *Ann N Y Acad Sci* 1994; 714:190-9.

Somjee SS, Warriar RP, Thomson JL, Ory-Ascani J, Hempe JM. Advanced glycation and products in sickle cell anaemia. *Br J Haematol* 2004; 128: 112-8.

Stahl M, Wilke HJ, Seeber S, Schmoll HJ. Cytokines and cytotoxic agents in renal carcinoma: a review. *Semin Oncol Rev* 1992; 19(2): 70-9.

Steinberg MH, Barton FB, Terrin ML. Fetal hemoglobin in sickle cell anemia determinants of response to hydroxyurea. *Blood* 1997; 89: 1078-83.

Stiegler G, Stohlawetz P, Brugger S, Jilma B, Vierhapper H, Hocker P, Panzer S. Elevated numbers of reticulated platelets in hyperthyroidism: direct evidence for an increase of thrombopoiesis. *Br J Haematol* 1998; 101: 656-8.

Tahara T, Usuki K, Sato H, Ohashi H, Morita H, Tsumura H, Matsumoto A, miyazaki H, Urabe A, Kato T. A sensitive sandwich ELISA for measuring thrombopoietin in human serum: serum thrombopoietin levels in healthy volunteers and in patients with haematopoietic. Disorders. *Br J Haematol* 1996; 93(4): 783-8.

Tàssies D, Reverter JC, Cases A, Calls J, Escolar G, Ordinas A. Effect of Recombinant Human Erythropoietin treatment on circulating reticulated platelets in uremic patients: association with early improvement in platelet function. *Am J Hematol* 1998; 59: 105-9.

Tomer A, Harker LA, Kasey S, Eckman JR. Thrombogenesis in sickle cell disease. *J Lab Clin Med* 2001; 137: 398-407.

Trowbridge EA, Martin JF, Slater DN. Evidence for a theory of physical fragmentation of megakaryocytes, implying that all platelets are produced in the pulmonary circulation. *Thromb Res* 1982; 28: 461-8.

Wagner MC, Eckman JR, Wick TM. Histamine increases sickle erythrocyte adherence to endothelium. *Br J Haematol* 2005; 132: 512-522.

Watanabe K, Takeuchi K, Kawai Y, Ikeda Y, Kubota F, Nakamoto H. Automated measurement of reticulated platelets in estimating thrombopoiesis. *Eur J Haematol* 1995; 54: 163-71.

Weiss G. Iron and anemia of chronic disease. *Kidney Int* 1999; 55: S12-S17.

Wendling F, Han ZC. Positive and negative regulation of megakaryocytopoiesis. *B Clin Haematol Rev* 1997; 10(1): 29-45.

Wendling F, Vainchenker W. Thrombopoietin and its receptor, the proto-oncogene c-mpl. *Curr Opin Hematol* 1995; 2: 331-9.

Wendling F. Thrombopoietin: its role from early hematopoiesis to platelet production. *Haematologica* 1999; 84:158-66.

Windus DW, Santoro S, Royal HD. The effects of hemodialysis on platelet deposition in prosthetic graft fistulas. *Am J Kidney Dis* 1995; 26: 614-21.

Wun T, Paglieroni T, Tablin F, Welborn J, Nelson K, Cheung A. Platelet activation and platelet-erythrocyte aggregates in patients cell anemia. *J Lab Clin Med* 1997; 129(5): 507-16.

Yeo EL, Sheppard JA, Feuerstein IA. Role P-selectin and leukocyte activation in polymorphonuclear cell adhesion to surface adherent activated platelets under physiologic shear condition (an injury vessel wall model). *Blood* 1994; 83: 2498-507.

10- ANEXOS



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

Caixa Postal 6111
13083-970 Campinas, SP

(0__19) 3788-8936

fax (0__19) 3788-8925

cep@head.fcm.unicamp.br

CEP, 17/12/02
(Grupo III)

PARECER PROJETO: N° 478/2002

I-IDENTIFICAÇÃO:

PROJETO: "AVALIAÇÃO DAS PLAQUETAS RETICULADAS NAS HEMOGLOBINOPATIAS"

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: José Fernando de Almeida Noronha

INSTITUIÇÃO: Departamento de Patologia Clínica/FCM/UNICAMP

APRESENTAÇÃO AO CEP: 28/10/2002

II - OBJETIVOS

Avaliar o comportamento das plaquetas reticuladas (PRs), e das interleucinas estimuladoras da megacariocitopoiese IL-3, IL-6 e IL-11 trombopoietina (TPO) e eritropoietina (EPO). Avaliar a ativação de PRs através da expressão da P-selectina em: indivíduos com diagnóstico de doença falciforme: SS, SC e S β , talassemia e β talassemia major e intermedia. Verificar a participação das PRs nos processos de vaso-oclusão e trombótico, comparando esses dados com os obtidos durante a fase "estável".

III - SUMÁRIO

O estudo será realizado com aproximadamente 100 pacientes atendidos no hemocentro e enfermaria do HC-UNICAMP, todos portadores de doença falciforme. Todos os pacientes deverão assinar, após leitura o termo de consentimento para ingressar no projeto. Cada sujeito da pesquisa permitirá a coleta de sangue para determinação das plaquetas reticuladas e diversas interleucinas estimuladoras da megacariocitopoiese. (IL-3, IL-6 e IL-11). Também serão dosados trombopoietina e eritropoietina. O trabalho deverá ser desenvolvido em 4 anos de acordo com cronograma apresentado.

IV - COMENTÁRIOS DOS RELATORES

O projeto é bem elaborado e tem valor científico e não apresenta problemas de ordem ética.

V - PARECER DO CEP

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, após acatar os pareceres dos membros-relatores previamente designados para o presente caso e atendendo todos os dispositivos das Resoluções 196/96 e 251/97, bem como ter aprovado o Termo do Consentimento Livre e Esclarecido, assim como todos os anexos incluídos na Pesquisa, resolve aprovar sem restrições o Protocolo de Pesquisa supracitado.

VI - INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES

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

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

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


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

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

Atenção: Projetos de Grupo I serão encaminhados à CONEP e só poderão ser iniciados após Parecer aprovatório desta.

VII - DATA DA REUNIÃO

Homologado na XII Reunião Ordinária do CEP/FCM, em 17 de dezembro de 2002.


Prof. Dr. Sebastião Araújo
PRESIDENTE do COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
FCM / UNICAMP

Serão mantidos o sigilo e o caráter confidencial das informações, zelando-se pela privacidade do paciente e garantindo-se que sua identificação não será exposta nas conclusões ou publicações.

Na necessidade de despesas de locomoção e alimentação, fica assegurado que o paciente participante receberá reembolso.

O paciente terá liberdade de abandonar a pesquisa em qualquer tempo sem ter sua assistência médica comprometida.

O telefone do pesquisador para esclarecer eventuais dúvidas é (19) 3788-7447 ou (19) 9109-2038.

O telefone da Secretaria do Comitê de Ética em Pesquisa para os casos de recursos ou reclamações dos pacientes é: (019) 3788-8936.

Campinas, ____ de _____ de 2003.

x _____
Assinatura do participante

Profa.Dra. Helena Z. Wolf Grotto

José Fernando de Almeida Noronha

11- APÊNDICES

Tabela VI: Dados dos parâmetros plaquetários no grupo controle.

amostras	sexo	idade (anos)	PLT(10 ⁹ /L)	P-LCR (%)	P-LCR (10 ⁹ /L)	CD62p* (%)	CD62p* (10 ⁹ /L)	IMF - CD62p	PRs (%)	PRs (10 ⁹ /L)	TO*CD62p* (%)	IMF - CD62p* (PRs)
1	F	27	205	29,6	60,68	1,46	2,99	294,2	1,33	2,73	37,63	2007,79
2	F	25	228	26,4	59,664	3,04	6,87	629,95	0,73	1,65	34,95	2667,42
3	M	33	243	20,8	50,544	2,44	5,93	486,46	1,74	4,23	35	1310,12
4	M	25	236	31,1	73,396	2,54	5,99	611,62	2,51	5,92	16,3	1713,21
5	F	44	240	26,2	62,88	0,94	2,26	308,747	0,61	1,46	20,35	4308,63
6	F	21	193	22,2	42,846	1,12	2,16	1384,29	0,6	1,16	58,8	3320,9
7	F	46	302	22,8	68,856	1,29	3,90	1340,66	0,63	1,90	17,1	4179,75
8	F	33	228	32,4	73,872	0,72	1,64	921,35	0,2	0,46	37,06	2556,46
9	F	34	236	28	66,08	0,88	2,08	1206,4	0,61	1,44	10,6	4200,45
10	M	24	195	25,1	48,945	1,11	2,16	1023,55	0,79	1,54	11,29	4690,86
11	F	31	341	29	98,89	0,85	2,90	1680,56	0,81	2,76	23,45	3541,34
12	F	50	295	13,6	40,12	1,11	3,27	728,72	0,54	1,59	36,63	2153,05
13	M	39	206	29,3	60,358	2,82	5,81	414,26	1,29	2,66	19,4	2489,43
14	F	22	277	29	80,33	1,22	3,38	1741,68	1,05	2,91	13,81	3909,57
15	M	22	257	17,4	44,718	0,74	1,90	652,99	0,81	2,08	16,25	2476,35
16	F	41	221	33,7	74,477	1,21	2,67	2845,87	1,31	2,90	14,46	3711,84
17	M	32	218	26,3	57,334	1,71	3,73	1218,8	1,3	2,83	14,59	2951,59
18	M	40	244	37,9	92,476	0,95	2,32	1772,2	1,28	3,12	24,06	3853,31
19	F	46	238	35,8	85,204	1,51	3,59	1514,25	0,94	2,24	6,63	4204,52
20	F	33	200	25,9	51,8	1,01	2,02	2872,44	1,29	2,58	14,32	4414,32
21	M	42	196	31,6	61,936	0,82	1,61	1803,06	1,09	2,14	12,16	3637,87
22	M	37	190	19,2	36,48	0,78	1,48	1231,99	0,68	1,29	22,16	4534,44
23	F	38	262	30,1	78,862	7,55	19,78	1925,84	6,83	17,89	29,71	3617,06
24	F	50	280	25,4	71,12	2,31	6,47	1022,11	1,18	3,30	39,69	1967,41
25	F	46	269	24,7	66,443	0,8	2,15	1883,96	0,62	1,67	31,52	3824,8
26	F	33	301	23,9	71,939	0,44	1,32	986,36	0,2	0,60	12,13	3949,61
27	F	23	193	31	59,83	0,59	1,14	1959,32	0,15	0,29	14,37	4268,44
28	M	43	228	24,7	56,316	0,56	1,28	1962,4	0,48	1,09	16,9	3087,74
29	F	39	332	28,2	93,624	0,9	2,99	1102,91	0,15	0,50	27,64	3419,34
30	M	26	181	33,5	60,635	0,62	1,12	1361,24	1,19	2,15	17,73	3965,91

Tabela VII: Dados dos parâmetros complementares no grupo controle.

amostras	sexo	idade (anos)	Leuco ($10^9/L$)	IRF (%)	IL-6 (pg/mL)	IL-3 (pg/mL)	sCD62p (ng/mL)	TPO (pg/mL)
1	F	27	8,62	10,4	1,72	13,3	10,8	458,4
2	F	25	5,51	4,6	0,61	8,9	14,6	119,7
3	M	33	8,21	14,4	1,52	0	19,6	236,7
4	M	25	7,23	10,2	1,63	0	22,2	332,0
5	F	44	4,81	10,5	1,31	0	10,5	113,4
6	F	21	5,38	2,5	1,18	0	10,8	136,0
7	F	46	6,02	12,4	1,3	0	8,1	129,4
8	F	33	7,16	10,8	1,01	0	6,9	173,8
9	F	34	4,22	5,2	1,63	0	7,5	170,0
10	M	24	3,32	7	0,74	17,3	8,2	146,0
11	F	31	8,6	4,9	1,56	116,4	11,4	154,3
12	F	50	4,92	15,5	1,35	68,8	9,7	236,7
13	M	39	4,98	8,6	2,34	113,1	8,1	165,8
14	F	22	5,41	9,3	1,18	0	8,5	178,0
15	M	22	8,67	4,9	2,57	0	7,6	113,4
16	F	41	8,25	4,2	1,25	0	9,8	170,6
17	M	32	5,41	5,2	1,96	0	5,3	160,4
18	M	40	7,87	9,2	1,42	0	4,2	177,8
19	F	46	4,84	9,3	1,55	0	2,6	312,2
20	F	33	4,72	5,7	1,16	0	2,7	182,5
21	M	42	6,65	12,3	1,34	17,3	2,6	197,2
22	M	37	7,82	12,8	1,57	7,5	5,8	175,4
23	F	38	9,33	9,5	1,06	3,1	3,2	173,8
24	F	50	6,52	11,1	0,74	8,9	2,8	173,0
25	F	46	5,26	6	1	13,3	3,4	179,4
26	F	33	6,88	8,1	1,47	0	3,7	157,2
27	F	23	7,46	4	3,24	0	2,4	166,7
28	M	43	5,65	10,9	1,41	0	4,6	172,2
29	F	39	4,97	16,4	1,08	17,7	3,2	177,0
30	M	26	6,89	4,9	1,05	20,6	2,6	163,5

Tabela VIII: Dados dos parâmetros plaquetários na fase "estável" das SF.

amostras	sexo	idade (anos)	diagnóstico	PLT(10 ⁹ /L)	P-LCR (%)	P-LCR (10 ⁹ /L)	CD82p (%)	CD82p (10 ⁹ /L)	IMF - CD82p	PRs (%)	PRs (10 ⁹ /L)	TO/CD82p (%)	TO/CD82p (10 ⁹ /L)	IMF - CD82p (PRs)
1	F	41	SC	443	23,8	105,434	3,41	15,11	1155,63	2,11	9,35	22,88	101,80	2343,26
2	F	44	SS	723	17,3	125,079	2,2	15,91	1439,35	0,9	6,51	24,86	180,46	2403,09
3	F	23	Sheta	548	18,6	101,556	3,22	17,58	2155,55	1,15	6,28	33,1	180,73	3213,66
4	F	48	SC	462	16,4	75,768	3,01	13,91	1023,8	0,99	4,57	50,09	231,42	3141,81
5	F	27	SS	453	13,5	61,155	1,79	10,1	1571,49	1,01	4,58	63,22	286,39	3068,42
6	F	30	Sheta	476	26,8	127,568	1,18	6,62	2696,88	1,51	7,19	23,66	112,62	3058,56
7	M	30	SC	444	18,8	83,472	1,85	8,21	2094,58	3,34	14,83	30,47	135,29	3382,07
8	F	43	SC	457	25,9	118,363	1,48	6,76	2027,3	2,98	13,62	57,88	264,51	3445,07
9	M	22	SS	586	18	105,48	0,97	5,68	2883,63	0,36	2,07	34,74	203,58	3232,63
10	M	42	SC	576	19,4	111,744	1,99	9,57	2967,03	0,49	2,36	66,36	66,36	3673,35
11	M	41	SC	481	19	91,39	1,99	10,17	1017,97	0,75	2,41	43,76	140,47	2160,84
12	F	26	SC	321	21,7	69,657	0,83	2,66	1865,93	0,96	2,36	32,68	66,36	3085,3
13	F	25	SC	162	23,9	38,718	0,93	1,51	974,79	0,96	1,56	23,98	38,85	2722,18
14	F	19	SC	282	31,2	81,744	0,68	1,78	1424,19	0,54	1,41	20,16	52,82	4374,4
15	F	41	SS	288	21,3	63,474	0,62	1,85	1028,73	0,2	0,60	25,42	75,75	2651,66
16	F	45	SS	209	31,9	66,671	0,58	1,21	2505,51	0,46	0,96	24,51	51,23	4851,31
17	F	43	SS	248	26,6	65,968	0,92	2,28	1546,58	0,24	0,60	13,91	34,50	3951,17
18	F	43	SS	405	26	105,3	4,18	16,93	773,89	0,64	2,59	10,37	42,00	3386,45
19	F	29	SS	563	18,3	103,029	0,42	2,36	1780,77	0,17	0,96	25,06	141,09	4180,84
20	F	35	SS	405	22,6	91,53	2,27	9,19	1202,04	0,2	0,81	10,02	40,53	3336,65
21	M	22	SS	550	35,5	195,25	1,25	6,88	2307,8	1,6	8,80	20,12	110,66	3572,98
22	M	43	SS	395	23,4	92,43	4,41	17,42	2355,74	1,13	4,46	3,33	13,15	3665,49
23	F	49	SC	381	22,1	84,201	0,95	3,62	2833,22	0,59	2,25	13,84	52,73	2376,19
24	F	23	Sheta	67	26,2	17,554	0,68	0,46	919,84	0,86	4,88	33,49	22,44	1717,84
25	F	43	Sheta	395	31,7	125,215	1,12	4,42	913,72	1,23	4,86	22,1	67,30	1522,18
26	M	30	SC	127	23	29,21	2,17	2,76	1181,61	0,68	0,86	6,97	8,85	4517,89
27	F	28	Sheta	452	19,9	89,948	1,34	6,06	2319,86	1,1	4,97	6,24	28,20	2545,03
28	M	30	SC	303	25,8	78,174	1,33	4,03	1574,44	0,93	2,82	19,42	58,84	2956,38
29	M	29	Sheta	583	18,4	109,112	1,83	11,44	1384,03	1,01	5,89	12,52	74,24	1650,85
30	F	33	Sheta	1027	19,8	203,346	1,01	10,37	1813,5	0,5	5,14	16,77	192,77	2652,38
31	F	48	SC	548	17,8	97,644	2,13	11,87	1141,2	2,53	13,86	12,33	67,57	1539,11
32	F	16,4	Sheta	411	16,4	67,404	1,71	7,03	1258,45	1,86	7,64	16,91	69,50	2702,3
33	M	52	SC	106	18,2	19,282	1,61	1,71	2383,54	1,86	1,48	17,27	18,31	2625,3
34	M	32	Sheta	443	22,2	98,346	2,54	11,25	1151,21	2,51	11,12	11,16	49,44	2768,03
35	F	24	Sheta	105	23,2	24,36	3,02	3,17	825,93	0,74	0,78	10,61	11,14	1488,58
36	F	31	Sheta	1030	19,2	197,76	4,36	44,91	561	1,58	16,27	11,07	114,02	1468,28
37	F	26	Sheta	535	24,1	128,835	0,84	4,49	1009,41	1,68	8,88	19,52	104,43	1501,85
38	M	34	Sheta	216	25,2	54,432	2,5	5,40	809,93	1,14	2,46	15,31	33,07	1458,87

Tabela IX: Dados dos parâmetros complementares na fase "estável" das SF.

amostras	sexo	idade (anos)	diagnósticos	Leuco (10 ⁹ /L)	IL-6 (pg/mL)	IL-3 (pg/mL)	sCD62p (ng/mL)	TPO (pg/mL)	uso de Hydrea
1	F	41	SC	8,15	3,62	0,0	8,3	782,6	não
2	F	44	SS	7,82	3,01	20,6	13,9	498,8	sim
3	F	23	Sbeta	9,12	1,23	36,8	10,4	206,2	não
4	F	48	SC	7,64	2,44	50,2	7,8	826,6	não
5	F	27	SS	7,57	3,30	63,7	7,5	136,0	não
6	F	30	Sbeta	4,48	2,36	22,1	13,6	237,6	não
7	M	30	SC	7,62	2,33	14,9	18,0	276,8	não
8	F	43	SC	7,09	1,95	23,5	12,6	372,4	sim
9	M	22	SS	4,78	8,36	11,8	7,2	293,4	não
10	M	42	SC	7,7	1,20	10,4	15,4	221,3	sim
11	F	41	SC	8,12	2,42	0,0	6,6	160,3	sim
12	F	26	SC	9,94	1,60	32,4	6,2	272,7	não
13	F	25	SC	5,46	0,58	30,9	3,6	448,5	sim
14	F	19	SC	11,6	0,60	6,0	5,7	177,0	sim
15	F	41	SS	8,56	4,23	20,6	4,6	327,6	não
16	F	45	SS	8,53	4,41	36,8	6,1	156,1	não
17	F	43	SS	10,03	1,51	14,8	12,5	268,6	não
18	F	43	SS	10,99	1,32	42,7	4,2	272,7	não
19	F	29	SS	8,37	1,55	19,1	5,6	161,1	não
20	F	35	SS	11,32	0,75	16,2	6,0	674,3	não
21	M	22	SS	7,93	2,77	17,7	23,7	184,2	não
22	M	43	SS	6	0,60	20,6	7,1	153,2	não
23	F	49	SC	9,26	1,00	19,6	6,9	170,6	não
24	F	23	Sbeta	5,84	8,70	21,6	3,7	219,6	não
25	F	43	Sbeta	7,03	1,60	72,4	6,4	229,8	não
26	M	30	SC	7,76	1,50	43,6	3,4	124,5	não
27	F	28	Sbeta	6,8	1,00	17,2	3,7	240,0	sim
28	M	30	SC	8,69	0,70	28,5	5,4	135,7	sim
29	M	29	Sbeta	8,19	0,70	15,8	5,0	179,4	sim
30	F	33	Sbeta	10,06	0,90	18,7	6,7	1524,1	não
31	F	49	SC	8,69	0,80	25,5	3,5	154,8	sim
32	F	28	Sbeta	10,05	0,70	21,1	3,3	154,8	não
33	M	52	SC	7,34	2,00	21,1	5,9	173,8	sim
34	M	32	Sbeta	18,84	2,80	14,8	18,2	184,9	não
35	F	24	Sbeta	5,54	3,20	12,4	4,4	159,5	não
36	F	31	Sbeta	8,17	0,90	30	12,7	482,3	sim
37	F	26	Sbeta	10,57	3,20	28,5	4,4	150,8	não
38	M	34	Sbeta	5,15	0,70	13,8	10,8	151,6	não

Tabela X: Dados dos parâmetros plaquetários na crise hemolítica das SF.

amostras	sexo	idade (anos)	diagnósticos	PLT (10 ⁹ /L)	P-LCR (%)	P-LCR (10 ⁹ /L)	CD62p (%)	CD62p (10 ⁹ /L)	IMF-CD62p*	PRs (%)	PRs (10 ⁹ /L)	TO*/CD62p* (%)	TO*/CD62p* (10 ⁹ /L)	IMF-CD62p*(PRs)
1	M	51	SS	249	19,1	47,559	2,32	5,78	1541,5	1,34	3,34	26,39	651,1	1802,37
2	M	53	SS	368	12,8	38,144	2,44	7,27	1452,59	2,37	7,06	35,1	100,17	4031,37
3	M	51	SS	368	35,1	129,168	4,42	16,27	1445,9	4,59	16,89	38,09	100,17	2329,01
4	M	50	SS	319	16,2	51,678	2,5	7,98	2523,39	1,11	3,54	47,76	152,35	2267,62
5	M	26	SS	361	14,3	51,623	1,44	5,20	2943,7	1,46	5,27	60,08	218,51	5148,12
6	M	26	SS	371	30,4	112,784	0,95	3,52	1487,76	2,58	9,57	50,5	296,99	3114,65
7	M	32	SS	453	21,9	99,207	1,69	7,66	2819,65	0,46	2,08	30,7	93,77	3932,61
8	M	39	SS	460	24,9	114,54	0,95	4,37	1520,92	0,24	0,9	30,19	138,87	3333,6
9	M	45	SS	344	23,9	76,48	0,87	2,78	1941,08	0,31	1,09	30,96	99,07	4081,96
10	F	37	SS	466	29,6	101,824	0,92	3,16	1757,59	1,04	3,68	43,76	150,53	2996,33
11	M	21	SS	455	12,8	58,24	0,99	8,76	1913,76	1,17	5,32	17,75	82,72	5631,03
12	F	43	SS	338	43,6	147,368	1,6	4,50	1736,45	0,66	2,23	40,2	135,88	1863,38
13	F	28	SS	336	33,7	113,232	1,59	5,41	622,95	0,68	2,33	20,54	69,01	3476,87
14	M	34	SS	765	22,5	160,65	0,43	3,29	1423,53	0,37	2,83	14,66	112,15	4517,84
15	F	42	SS	248	26,6	65,968	0,92	2,28	1546,53	0,24	0,60	34,50	34,50	3205,25
16	F	43	SS	380	22,5	85,5	1,11	4,22	981,76	0,82	3,12	12,44	47,27	3951,17
17	M	28	SS	386	30,8	118,898	0,57	1,11	2372,82	0,63	2,43	25,2	87,27	3520,41
18	M	29	SS	750	15,9	119,25	0,56	4,50	1086,59	0,3	2,26	23,62	177,15	3632,91
19	F	16	SS	298	28,2	84,036	1,45	4,32	1900,44	0,94	2,80	15,09	44,97	4123,99
20	F	54	SS	228	18,7	42,636	1,32	3,56	867,34	2,59	5,91	49,39	112,61	1531,53
21	M	51	SS	264	27,8	73,392	0,35	2,30	1338,32	0,77	2,03	8,02	21,17	2268,28
22	F	24	SS	622	22,1	151,462	2,45	10,36	2572,69	0,4	2,49	10,24	63,69	1723,75
23	M	27	SS	423	17,8	75,279	1,92	8,52	1661,82	0,37	1,57	6,71	36,84	2664,86
24	F	40	SS	444	22,3	95,892	1,77	16,00	858,4	0,8	3,55	11,9	52,84	1815,53
25	F	23	SC	377	19,6	124,952	1,15	4,15	1680,19	0,94	3,54	11,71	44,15	2136,24
26	M	24	Subeta	377	19,6	124,952	1,15	4,15	1680,19	0,94	3,54	11,71	44,15	2136,24
27	F	19	Subeta	508	24,6	124,958	4,15	21,08	778,57	1,11	5,64	9,19	46,69	1815,04

Tabela XI: Dados dos parâmetros complementares na crise hemolítica das SF.

amostras	sexo	idade (anos)	diagnósticos	Leuco (10 ⁹ /L)	IL-6 (pg/mL)	IL-3 (pg/mL)	sCD62p (ng/mL)	TPO (pg/mL)	uso de Hydræa
1	M	51	SS	8,05	2,37	13,3	13,6	122,9	sim
2	M	33	SS	14,79	11,96	0,0	12,5	639,7	não
3	M	21	SS	14,74	44,20	14,8	5,6	424,1	sim
4	M	50	SS	9,81	4,09	11,8	7,0	285,0	não
5	M	24	SS	9,57	194,70	4,6	6,2	473,4	não
6	M	29	SS	12,4	6,65	25,0	6,3	172,2	não
7	M	32	SS	13,98	2,07	0,0	9,7	264,5	não
8	M	39	SS	12,54	1,80	89,5	14,0	405,0	não
9	M	45	SS	10,1	6,20	51,7	8,0	662,7	não
10	F	37	SS	9,08	2,78	23,5	5,1	165,8	não
11	M	21	SS	12,69	35,60	25,0	11,8	149,9	não
12	F	43	SS	14,08	4,88	78,8	6,4	405,0	não
13	F	28	SS	7,34	5,24	118,8	10,7	406,7	não
14	M	34	SS	13,52	6,15	98,7	12,4	177,1	não
15	F	42	SS	9,86	7,62	23,5	13,1	306,1	não
16	F	43	SS	10,03	1,51	14,8	12,5	268,6	não
17	M	28	SS	9,29	33,40	22,1	6,1	264,5	sim
18	M	29	SS	14,43	5,21	1262,6	6,6	187,8	não
19	F	16	SS	10,63	87,20	164,5	11,3	289,2	não
20	F	54	SS	10,54	5,21	10,7	5,7	524,8	não
21	M	51	SS	8,89	2,58	39,8	10,4	285,0	não
22	F	24	SS	7,7	0,5	16,7	5,3	161,12	não
23	M	27	SS	13,9	1,4	25,5	11,9	167,47	sim
24	F	40	SS	5,07	11,2	74,6	4,3	146,02	não
25	F	23	SC	10,08	6,9	20,1	3,5	125,28	não
26	M	24	Sbeta	8,86	1,8	16,7	3,8	173,81	não
27	F	19	Sbeta	16,22	1,2	39,5	3,5	175,4	não

Tabela XII: Dados dos parâmetros plaquetários na crise vaso-oclusiva das SF.

amostras	sexo	Idade (anos)	diagnósticos	PLT(10 ⁹ /L)	P-LCR (%)	P-LCR (10 ⁹ /L)	CD62p (%)	CD62p (10 ⁹ /L)	IMF-CD62p ²	PRs (%)	PRs (10 ⁹ /L)	TO ² /CD62p (%)	TO ² /CD62p (10 ⁹ /L)	IMF - CD62p ² (PRs)
1	F	26	SS	567	28,1	159,327	9,43	53,47	754,9	2,43	13,78	19,21	108,92	2110,65
2	F	26	SS	522	26,1	136,242	4,19	21,87	1162,72	2,52	13,15	48,38	242,10	1522,92
3	M	30	SC	390	19,3	75,27	4,21	16,42	2080,61	3,52	13,73	5,26	20,51	1910,4
4	F	16	SS	634	16,8	106,512	2,11	13,38	1377,57	0,82	3,93	45,56	288,85	2188,92
5	M	29	SS	545	24,4	132,98	2,3	12,54	1215,6	1,6	8,72	29,04	158,27	2317,14
6	F	35	SS	510	25,2	128,52	5,61	28,61	1511,89	2,37	12,09	12,22	62,32	3950,61
7	F	27	SC	738	19,6	144,648	1,69	12,47	3817,69	3,12	23,03	12,96	95,64	6384,1
8	M	27	SS	428	31	132,99	4,75	20,38	2212,48	3,16	13,56	13,22	56,71	6121,42
9	M	35	SS	382	25,2	99,264	1,07	4,09	2334,49	0,56	2,14	13,94	53,25	3878,45
10	M	45	SS	375	19,2	72	0,97	3,84	1013,71	2,49	9,34	20,84	78,15	2840,39
11	F	27	Shelta	739	18,5	136,715	1,72	12,71	984,14	1,07	7,91	30,61	228,21	3258,37
12	F	44	SS	581	25,4	147,574	0,64	3,72	1154,62	0,91	5,29	18,83	109,98	3551,28
13	F	18	SS	442	20,7	91,494	1,05	4,64	1333,74	0,57	2,82	22,6	99,89	3922,02
14	M	29	SS	695	8,6	60,28	1,11	7,80	170,63	0,58	3,84	14,67	100,49	1884,23
15	F	28	SS	471	27,5	128,525	0,68	3,06	1241,72	0,86	4,52	36,35	171,21	2857,25
16	M	22	SS	441	35,1	154,791	1,3	5,73	1074,05	1,81	7,98	34,09	190,34	2895,33
17	M	26	SC	473	40,9	193,457	1,96	7,38	1699,44	1	4,73	20,2	95,55	3722,34
18	F	44	SS	420	38,4	161,28	0,64	2,69	1690,84	0,49	2,08	28,34	110,63	3252,77
19	M	22	SS	401	28,5	106,285	2,5	10,03	843,54	1,51	6,08	19,73	67,09	2240,61
20	M	44	SS	398	36,3	121,968	1,16	3,90	2579,76	0,24	0,81	4,41	14,62	3115,2
21	M	25	SC	733	28,8	211,104	2,27	16,64	2206,97	1,3	9,53	11,48	84,15	2897,73
22	F	31	SS	580	12,5	72,5	2,74	15,89	2849,7	2,22	12,88	16,83	97,61	2136,58
23	F	30	SS	615	11,4	70,11	3,66	22,51	2498,54	2,48	15,25	15,64	2406,63	2406,63
24	M	30	SS	283	22,5	65,925	1,75	5,13	1417,73	1,39	4,07	34,09	99,88	1309,5

Tabela XIII: Dados dos parâmetros complementares na crise vaso-oclusiva das SF.

amostras	sexo	idade (anos)	diagnósticos	Leuco (10 ⁹ /L)	IL-6 (pg/mL)	IL-3 (pg/mL)	sCD62p (ng/mL)	TPO (pg/mL)	uso de Hydreia
1	F	26	SS	15,19	4,34	11,8	11,8	213,7	não
2	F	26	SS	15,62	2,26	0,0	22,7	169,9	não
3	M	30	SC	4,41	6,67	50,2	18,3	240,6	sim
4	F	16	SS	6,87	13,90	22,1	7,6	281,6	não
5	M	29	SS	6,91	4,55	35,3	5,0	289,2	não
6	F	35	SS	11,83	5,68	22,1	8,2	236,7	não
7	F	27	SC	10,11	12,25	16,2	19,3	524,8	sim
8	M	27	SS	14,12	141,30	65,2	6,7	438,7	não
9	M	35	SS	9,87	3,54	0,0	9,4	354,2	sim
10	M	45	SS	9,43	388,50	8,9	4,6	567,5	não
11	F	27	Sbeta	12,05	3,23	50,2	19,9	235,3	não
12	F	44	SS	9,32	2,97	3,1	7,7	390,9	não
13	F	18	SS	12,54	2,72	30,9	8,6	198,8	não
14	M	29	SS	11,06	404,50	25,0	7,7	107,1	não
15	F	26	SS	12,56	1,52	35,3	9,0	177,0	não
16	M	22	SS	13,84	7,47	28,0	15,7	163,0	não
17	M	26	SC	12,57	6,69	45,7	10,1	306,1	não
18	F	44	SS	4,28	3,56	4,6	9,7	166,5	não
19	M	22	SS	10,8	1,90	16,7	5,0	197,5	não
20	M	44	SS	9,33	3,00	26,5	7,5	142,0	não
21	M	25	SC	20,56	9,90	18,7	11,9	168,3	não
22	F	31	SS	6,43	2,50	61,2	6,2	756,0	sim
23	F	30	SS	13,66	11,60	37,0	3,9	337,9	sim
24	M	30	SS	14,77	12,50	15,8	3,9	180,2	não