



**VENINA MARCELA DOMINICAL**

**AVALIAÇÃO DAS INTERAÇÕES HETEROTÍPICAS  
DE NEUTRÓFILOS EM PACIENTES COM  
ANEMIA FALCIFORME**

**CAMPINAS**

**2014**





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

**VENINA MARCELA DOMINICAL**

**AVALIAÇÃO DAS INTERAÇÕES HETEROTÍPICAS DE NEUTRÓFILOS**  
**EM PACIENTES COM ANEMIA FALCIFORME**

**Orientadora: Nicola Amanda Conran Zorzetto**

**Coorientador: Fernando Ferreira Costa**

*Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-  
Graduação em Fisiopatologia Médica da Faculdade de Ciências  
Médicas para obtenção do título de Doutora em Ciências.*

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL  
DA TESE DEFENDIDA PELA ALUNA **VENINA  
MARCELA DOMINICAL** E ORIENTADA PELA **DRA.  
NICOLA AMANDA CONRAN ZORZETTO**.

Assinatura da Orientadora

---

**CAMPINAS**

**2014**

---

Ficha catalográfica  
Universidade Estadual de Campinas  
Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas  
- CRB

D713a Dominical, Venina Marcela, 1984-  
Avaliação das interações heterotípicas de neutrófilos em pacientes com anemia falciforme / Venina Marcela Dominical. – Campinas, SP : [s.n.], 2014.

Orientador: Nicola Amanda Conran Zorzetto.  
Coorientador: Fernando Ferreira Costa.  
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Anemia falciforme. 2. Comunicação celular. 3. Neutrófilos. 4. Plaquetas. I. Zorzetto, Nicola Amanda Conran. II. Costa, Fernando Ferreira, 1950-. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

**Título em outro idioma:** Heterotypic interactions of neutrophils in sickle cell anemia patients

**Palavras-chave em inglês:**

Sickle cell anemia

Cell communication

Neutrophils

Platelets

**Área de concentração:** Fisiopatologia Médica

**Titulação:** Doutora em Ciências

**Banca examinadora:**

Nicola Amanda Conran Zorzetto [Orientador]

Alessandra Gambero

Dimas Tadeu Covas

Fabiola Traina

Margareth Castro Ozelo

**Data de defesa:** 03-07-2014

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

---

**BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE DOUTORADO**

**VENINA MARCELA DOMINICAL**

---

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

---

**MEMBROS:**

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



2. PROF(A). DR(A). ALESSANDRA GAMBERO



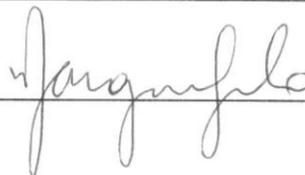
3. PROF(A). DR(A). DIMAS TADEU COVAS



4. PROF(A).DR(A). FABÍOLA TRAINA



5. PROF(A).DR(A). MARGARETH CASTRO OZELO



---

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

Data: 03 de julho de 2014

---



## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a **Deus** por ter me guiado pelos caminhos corretos e pelas oportunidades e coisas boas oferecidas durante toda a minha jornada acadêmica. Sem a presença e fé Nele, não teria alcançado meus objetivos ou obtido sabedoria para conquistar tudo o que conquistei. Em especial, agradeço a minha **família (Devanir, Carmen, Luma e Renan)** por todo o carinho, compreensão, conselhos e apoio dispendidos em toda a minha vida, eles são a minha base e meu exemplo de união e família. Amo vocês!

Gostaria de agradecer a minha orientadora **Nicola Conran**, por ter me orientado tão bem cientificamente e profissionalmente e por ser um exemplo de uma líder bondosa, sempre pronta a compreender e ensinar, uma pesquisadora humana e bem sucedida no que faz. Agradeço ao **Dr. Fernando Costa** pelo suporte e auxílio científico e pela coorientação neste trabalho. Agradeço também aos **participantes desta pesquisa**, pela doação de sangue para realização dos experimentos, obrigada pela confiança depositada em mim e Muito Obrigada a **todos funcionários do hemocentro**, vocês foram peças fundamentais para a realização deste trabalho..

Agradecimento especial **às amigas e aos colegas de laboratório**, aos que passaram e aos que continuam por aqui, pelos ensinamentos, risadas, companhias de happy hour, por todas as experiências vividas e pela força e torcida em cada conquista e etapa alcançada por mim. Agradeço de uma maneira geral, pois são muitos, mas todos possuem uma parcela de participação especial em minha vida. Obrigada **alunas da Nic**, obrigada **alunos do Dr. Fernando**, obrigada por tudo a todos!

Agradeço a todos meus **amigos e familiares** fora do Hemocentro, que dividiram comigo esta fase da minha vida e me fizeram mais feliz. Agradeço também **aos colegas e amigos** feitos durante o período de estágio no **NIH** (National Institutes of Health), obrigada pelo aprendizado, amadurecimento e crescimento profissional.

Obrigada à **FAPESP** (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) pelo apoio financeiro para a realização e divulgação deste trabalho e pelo estágio de pesquisa no exterior (BEPE).

**Muito obrigada a todos!**



## RESUMO

A anemia falciforme (AF) é uma hemoglobinopatia hereditária que resulta de uma mutação no gene da globina beta. Essa mutação leva a formação de uma hemoglobina (Hb) com propriedades físico-químicas anormais, denominada HbS. A vaso-oclusão é a principal complicação aguda e a principal causa de morbidade da doença falciforme, compreendendo um processo multicelular que parece ser iniciado pela adesão de hemácias e leucócitos ao endotélio ativado, causando a obstrução vascular e isquemia tecidual. A adesão de hemácias ao endotélio contribui para a redução do fluxo sanguíneo na AF, entretanto, leucócitos também parecem exercer um papel fundamental neste processo, pois são células maiores, menos flexíveis e seu recrutamento para a microvasculatura e subsequente interação com as células circulantes sanguíneas promove a redução do fluxo sanguíneo nos vasos. Assim, investigações na dinâmica de interações heterocelulares são áreas potencialmente atrativas para pesquisa, pois elas podem contribuir para melhorar o entendimento de mecanismos de inflamação vascular e para o desenvolvimento de novos alvos terapêuticos para doenças como a AF. O objetivo deste projeto foi estudar as interações heterotípicas dos neutrófilos com plaquetas, células vermelhas e células endoteliais em células de pacientes com AF e as moléculas de adesão celular envolvidas nestas interações, utilizando uma plataforma microfluidica (quantifica adesão celular em fluxo em biochips com canais paralelos), citometria de fluxo com imagem (imagem simultânea das células obtidas pelo citômetro) e o desenvolvimento de um biochip para estudo dos processos vaso-oclusivos (para utilização na plataforma microfluidica). Sangue periférico de indivíduos saudáveis (controles) e pacientes com anemia falciforme (em uso ou não da terapia de hidroxiureia – HU) foi coletado e os experimentos realizados. Observamos que células vermelhas de pacientes AF sem uso da HU aderem mais, quando em fluxo, à laminina e interagem mais aos neutrófilos autólogos aderidos ao endotélio ativado. Quando avaliada a participação das principais moléculas de adesão expressas no endotélio, E-selectina e ICAM-1, na promoção das interações de eritrócitos com neutrófilos aderidos, observamos que a duração destas interações heterotípicas em células provenientes dos pacientes AF, é mais prolongada na presença do ligante E-selectina. Neutrófilos de pacientes com AF também circulam mais

em agregados a plaquetas ou células vermelhas no sangue periférico, comparados aos neutrófilos de indivíduos saudáveis. Os reticulócitos demonstraram ser o principal tipo de eritrócito envolvido nos agregados de neutrófilos circulantes e os níveis de hemoglobina fetal correlacionaram-se inversamente à porcentagem encontrada de agregados de neutrófilo-reticulócito no sangue periférico destes pacientes. As plaquetas demonstraram papel de destaque na formação e participação nos agregados circulantes de neutrófilos a células vermelhas e experimentos utilizando anticorpos bloqueadores ou inibidor, indicaram que as moléculas de adesão P-selectina, na plaqueta, Mac-1 no neutrófilo, VLA-4 nos reticulócitos e ICAM-4 nas hemácias podem ser as responsáveis pela interação dos neutrófilos a estas células. Neutrófilos de pacientes AF também obstruíram significativamente mais os microcanais com diâmetros de 25 a 40µm do biochip desenvolvido por nós para estudar os processos vaso-oclusivos, comparados aos neutrófilos de indivíduos controle. Quando misturamos suspensões de neutrófilos a eritrócitos, observamos uma obstrução ainda maior destes microcanais. Diante destes resultados, é possível concluir que neutrófilos de pacientes AF interagem significativamente mais às células vermelhas quando aderidos ao endotélio, circulam agregados a eritrócitos e plaquetas no sangue, além de possuírem maior capacidade de obstrução *in vitro* em microcanais que mimetizam vênulas de pequeno calibre. A terapia com HU parece afetar apenas as interações de neutrófilo na presença do endotélio vascular. Terapias que visem à inibição das moléculas de adesão Mac-1 e P-selectina na patologia da anemia falciforme parecem ser promissoras.

## ABSTRACT

Sickle cell anemia (SCA) is a hereditary hemoglobinopathy that results from a mutation in the beta globin gene. This mutation leads to the formation of an abnormal hemoglobin (Hb), known as HbS. Vaso-occlusion is the major acute complication and the major cause of morbidity in SCA; it comprises a multicellular process that appears to be initiated by the adhesion of red blood cells (RBCs) and leukocytes to the activated endothelium, causing vascular obstruction and tissue ischemia. The adhesion of sickle RBCs to the endothelium contributes to decrease blood flow; however, leukocytes also seem to play a key role in this process as these cells are bigger, less flexible and their recruitment to the microvasculature and subsequent interaction with circulating blood cells promotes reduced blood flow in vessels. Research into the dynamics of heterocellular interactions is a potentially attractive area of research, since such data may improve our understanding of the mechanisms involved in vascular inflammation and contribute to the development of new therapeutic targets in diseases such as SCA. The aim of this project was to study the heterotypic interactions of neutrophils with platelets, red cells and endothelial cells in cells from SCA individuals and the possible adhesion molecules involved in these interactions, using microfluidic techniques (cell adhesion flow in biochips with parallel channels), imaging flow cytometry (simultaneous imagery of cells acquired by flow cytometry) and the development of a biochip for the study of vaso-occlusive processes (for use in conjunction with the microfluidic platform). Peripheral blood from healthy individuals (controls) and sickle cell anemia patients (with or without hydroxyurea therapy - HU) were collected and the experiments were performed. RBCs from SCA patients without HU were observed to adhere more, under flow, to laminin-coated biochips and they interact more with autologous neutrophils previously adhered to an activated endothelium. When evaluating the participation of the two main adhesion molecules expressed on activated endothelium, E-selectin and ICAM-1, in promoting interactions of RBCs to adherent neutrophils, we found that the duration of these heterotypic interactions for cells from SCA patients was longer in the presence of E-selectin ligand. Neutrophils from SCA patients also circulate aggregated to platelets or RBCs in the peripheral blood significantly more than the neutrophils of

healthy individuals. Reticulocytes were the main RBC type involved in these neutrophil-RBC aggregates and the levels of fetal hemoglobin were inversely correlated to the percentage of the neutrophil- reticulocyte aggregates found in the peripheral blood of these patients. Platelets demonstrated a prominent role in the formation of the circulating neutrophil-RBCs aggregates, and function-blocking antibodies or inhibitors indicated that the adhesion molecules P-selectin, on platelets, Mac-1, on neutrophils, VLA-4, on reticulocytes, and ICAM-4, on mature erythrocytes, may be responsible for the interactions of neutrophils with these cells. Neutrophils from SCA patients also demonstrated a significant capacity to obstruct microchannels with diameters of between 25 and 40 $\mu$ m, of the biochip developed by us to study vaso-occlusive processes, compared to the cells from control subjects. When mixed suspensions of neutrophils and autologous RBCs were applied to the chips, we observed an even greater obstruction of these microchannels. In summary, we conclude that SCA neutrophils interact significantly more with red cells when adhered to endothelial cells, circulate aggregated to erythrocytes in the peripheral blood of these patients, and present a greater capacity to obstruct microchannels that mimic small venules *in vitro*. HU therapy appears to affect only neutrophil interactions in the presence of the vascular endothelium. Therapies that target molecules such Mac-1 and P-selectin in sickle cell disease seem to be promising strategies.

## LISTA DE ABREVIATURAS

ACD - Ácido Cítrico Dextrose

AF - Pacientes com anemia falciforme

AFHU - Pacientes com anemia falciforme em terapia com hidroxiureia

ANOVA – Análise de variância

APC - *Allophycocyanin*

BSA – *Bovine Serum Albumin* (soro albumina bovina)

CD11a - Subunidade  $\alpha$  da integrina LFA-1

CD11b - Subunidade  $\alpha$  da integrina Mac-1

CD16 - Receptor Fc $\gamma$ RIIIa

CD41a – proteína do complexo GP IIb/IIIa

CD62E - E-selectina

CD62P - P-selectina

CD66b - Molécula de adesão celular relacionada ao antígeno carcinoembrionário 8

CD71 – receptor de transferrina

CD235a – glicoforina A

CON - Controles (indivíduos saudáveis)

d – *dynes* (dina - unidade de medida de força em fluídos)

ET-1 - endotelina 1

FAP – Fator ativador plaquetário

Fb - Fibrinogênio

FBS - *Fetal Bovine Serum* (soro bovino fetal)

FITC - *Fluorescein Isothiocyanate*

Fn - Fibronectina

FSC - *Forward scatter*

FT - Fator tecidual

FvW – Fator de von Willebrand

GVHD – doença do enxerto versus hospedeiro

HbF - Hemoglobina Fetal

HbS - Hemoglobina S

HU - Hidroxiureia

HUVEC - Células Endoteliais de Veia Umbilical Humana

ICAM- Molécula de Adesão Intercelular

IL-1 $\beta$  - Interleucina 1 beta

IL-6 – Interleucina 6

IL-8 - Interleucina 8

IL-10 – Interleucina 10

LFA-1 - Antígeno-1 associado à função linfocitária

Mac-1 - Antígeno de macrófago 1

MEC – Matriz extracelular

MIF – Média de intensidade de fluorescência

NET - *neutrophil extracellular traps*

NO – Óxido nítrico

PBS - *Phosphate Buffered Saline* (solução salina tamponada com fosfato)

PE - *Phycoerythin*

Plq - Plaquetas

PRP - Plasma Rico em Plaquetas

PSGL-1 – ligante de P-selectina 1

ROS – Espécies reativas de oxigênio

SSC - *Side Scatter*

TA - Temperatura Ambiente

TNF- $\alpha$  - Fator de Necrose Tumoral alfa

U.A. - Unidades arbitrárias

VCAM- Molécula de Adesão Vascular

VLA-4 – antígeno de expressão tardia 4

$\alpha$ IIb $\beta$ 3 - Integrina alfa IIb beta 3 (GPIIb/IIIa, receptor para fibrinogênio)



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Detalhes clínicos dos pacientes participantes deste estudo (população brasileira – Hemocentro, UNICAMP, Campinas, Brasil) .....	71
Tabela 2. Detalhes clínicos dos pacientes participantes deste estudo (população americana – NHLBI, NIH, USA).....	92
Tabela 3. Média de intensidade de fluorescência das integrinas $\beta_2$ : LFA-1 (CD11a), Mac-1 (CD11b) e da proteína CD66b na superfície de neutrófilos .....	101
Tabela 4. Correlação da porcentagem de agregados de neutrófilo-células vermelhas no sangue periférico de pacientes .....	105



## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Mecanismo de vaso-oclusão na anemia falciforme. ....37
- Figura 2. Dinâmica da interação de leucócitos às plaquetas e células vermelhas. ....43
- Figura 3. Adesão em fluxo de neutrófilos ( $5 \times 10^6$  /mL) à fibronectina (Fn;  $20 \mu\text{g/mL}$ ) por 3 minutos, sob força de cisalhamento de  $0,5 \text{ d/cm}^2$  e  $37^\circ\text{C}$ . . ....73
- Figura 4. Adesão em fluxo *in vitro* de plaquetas ( $2 \times 10^8$  /mL) ao Fibrinogênio (Fb;  $50 \mu\text{g/mL}$ ) por 3 minutos, força de cisalhamento de  $0,5 \text{ d/cm}^2$  e à  $37^\circ\text{C}$ .....74
- Figura 5. Interações de plaquetas (Plq) com neutrófilos previamente aderidos; Neutrófilos ( $5 \times 10^6$  /mL) de indivíduos controle (CON), (A) pacientes com anemia falciforme (AF) e (B) pacientes com anemia falciforme em terapia com HU (AFHU) estavam aderidos à Fn ( $20 \mu\text{g/mL}$ ) através do ensaio de adesão em fluxo de  $0,5 \text{ d/cm}^2$  e  $37^\circ\text{C}$  e, em seguida, o PRP ( $2 \times 10^8$  células/mL) de CON e pacientes AF (A) ou AFHU (B) foi dispensado por 3 minutos a  $0,5 \text{ d/cm}^2$ , e avaliadas as interações heterotípicas das células.....75
- Figura 6. Interações de neutrófilos (Neut) com plaquetas previamente aderidas ao Fb; Plaquetas ( $2 \times 10^8$  /mL) de indivíduos controle (CON), (A) pacientes com anemia falciforme (AF) e (B) pacientes com anemia falciforme em terapia com HU (AFHU) estavam aderidas ao Fb ( $50 \mu\text{g/mL}$ ) através do ensaio de adesão em fluxo de  $0,5 \text{ d/cm}^2$  e  $37^\circ\text{C}$  e, em seguida, neutrófilos ( $5 \times 10^6$  /mL) de CON e pacientes AF (A) ou AFHU (B) foram dispensados por 3 minutos a  $0,5 \text{ d/cm}^2$ , e avaliadas as interações heterotípicas das células. ....76
- Figura 7. Adesão em fluxo *in vitro* de neutrófilos (Neut) de indivíduos controles (CON) e pacientes AF em terapia ou não com a HU, na presença de plaquetas (CON e pacientes AF) previamente aderidas aos microcanais revestidos com Fb ( $50 \mu\text{g/mL}$ ). Fluxo de 3 min., força de cisalhamento de  $0,5 \text{ d/cm}^2$  e à  $37^\circ\text{C}$ . ....77
- Figura 8. (A) Média do número de interações de hemácias ( $1 \times 10^7$  /mL) por neutrófilo autólogo ( $5 \times 10^6$  /mL) aderido à proteína recombinante fibronectina ( $20 \mu\text{g/mL}$ ) num biochip (canal  $400 \mu\text{m}$ ); (B) Duração em segundos da captura de hemácias por estes neutrófilos; Neutrófilos foram permitidos a aderir por 2 minutos ( $0,7 \text{ d/cm}^2$ ), em seguida, foram adicionadas hemácias em fluxo por 2 minutos ( $0,3 \text{ d/cm}^2$ ) e avaliada as interações das células. Células provenientes de Controle (CON, n=05), pacientes AF (AF, n=02) e pacientes AF em terapia com HU (AFHU, n=03).....79
- Figura 9. (A). Adesão de neutrófilos de indivíduos controles ( $5 \times 10^6$  /mL) às HUVECs ( $1 \times 10^7$  /mL/canal) cultivadas em biochips ( $800 \mu\text{m}$ ), na ausência ou presença de estímulo inflamatório promovido pelo TNF- $\alpha$  ( $10 \text{ ng/mL}$  por 3h). Fluxo de 3 minutos, sob força de cisalhamento de  $0,5 \text{ d/cm}^2$  à  $37^\circ\text{C}$ ; n=05. \*P<0.05 de acordo com teste t pareado. Imagens representativas de neutrófilos controles aderidos a HUVECs (B) sem estímulo (basal) e (C) ativadas por TNF- $\alpha$ . Foi determinado o número de células aderidas num campo de visão de  $0,08 \text{ mm}^2$ , com objetiva de magnificação de 40X. ....80

Figura 10. Adesão de neutrófilos ( $5 \times 10^6$  /mL) às HUVECs ( $1 \times 10^7$  /mL/canal) cultivadas em biochips (800 $\mu$ m), na presença de estímulo inflamatório promovido pelo TNF- $\alpha$  (10ng/mL; 2h). Fluxo de 2 minutos, sob força de cisalhamento de 0,7 d/cm<sup>2</sup>. Células provenientes de controles (CON, n=10), pacientes com anemia falciforme (AF, n=07) e pacientes com anemia falciforme em uso da terapia com HU (AFHU, n=10); P>0.05. Foi determinado o número de células aderidas num campo de visão de 0.08mm<sup>2</sup>. .....81

Figura 11. (A) Média do número de interações de hemácias ( $1 \times 10^7$  /mL) com os neutrófilos autólogos ( $5 \times 10^6$  /mL) aderidos às HUVECs ( $1 \times 10^7$ /mL/canal; TNF- $\alpha$  10ng/mL, 2h) cultivadas nos microcanais dos biochips; \*P<0.05, comparado aos grupos controle e AFHU, de acordo com ANOVA seguido pelo teste de Tukey; (B) Duração em segundos da captura de hemácias por estes neutrófilos; Neutrófilos foram permitidos a aderir por 2 minutos (0,7 d/cm<sup>2</sup>) e, em seguida, foram adicionadas hemácias em fluxo por mais 2 minutos (0,3 d/cm<sup>2</sup>). Células provenientes de Controle (CON, n=10), pacientes AF (AF, n=12) e pacientes AFHU (AFHU, n=09); (C) Imagem adquirida com objetiva de magnificação de 40X, de neutrófilos aderidos a HUVECs e hemácias em fluxo e representação em maior aumento (quadrante branco - imagem ampliada em 11 X) da interação neutrófilo-hemácia; seta branca apontando hemácia. ....82

Figura 12. (A). Adesão de hemácias ( $5 \times 10^6$  células/mL) à laminina (2 $\mu$ g/cm<sup>2</sup>) por 3 minutos, sob força de cisalhamento de 0,5 d/cm<sup>2</sup>. Células provenientes de Controles (CON, n=07), pacientes AF (AF, n=07) e pacientes AF em uso da terapia com HU (AFHU, n=04); \*\*\*P<0.001, comparado ao grupo Controle e AFHU, de acordo com ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni. (B) Imagem representativa adquirida com objetiva de magnificação de 40X, da adesão de hemácias de paciente AF em microcanal em campo de visão de 0.08 mm<sup>2</sup>. .....83

Figura 13. Média do número de interações de hemácias ( $1 \times 10^7$  células/mL) por neutrófilo não-autólogo ( $5 \times 10^6$  células/mL) aderido a HUVECs cultivadas no biochip; Neutrófilos foram permitidos a aderir por 2 minutos (0,7 d/cm<sup>2</sup>) e, em seguida, foram adicionadas hemácias em fluxo por 2 minutos (0,3 d/cm<sup>2</sup>) e avaliadas as interações heterotípicas. Células provenientes de controles (CON, n=10) e pacientes AF (AF, n=10); P>0.05.....84

Figura 14. (A) Média do número de interações de hemácias ( $1 \times 10^7$  /mL) com neutrófilos autólogos ( $5 \times 10^6$  /mL) aderidos a proteína recombinante ICAM-1 (10 $\mu$ g/mL) nos microcanais dos biochips; (B) Duração em segundos da captura de hemácias por estes neutrófilos; P>0.05. Neutrófilos foram permitidos a aderir por 2 minutos (0,7 d/cm<sup>2</sup>) e, em seguida, foram adicionadas hemácias em fluxo por mais 2 minutos (0,3 d/cm<sup>2</sup>). Células provenientes de Controle (CON, n=08), pacientes AF (AF, n=05) e pacientes AFHU (AFHU, n=05); (C) Imagem adquirida com objetiva de magnificação de 40X, de neutrófilos aderidos a ICAM-1 e hemácias em fluxo e representação em maior aumento (quadrante branco - imagem ampliada em 12 X) da interação neutrófilo-hemácia; seta branca apontando hemácia.....86

Figura 15. (A) Média do número de interações de hemácias ( $1 \times 10^7$  /mL) com neutrófilos autólogos ( $5 \times 10^6$  /mL) aderidos a proteína recombinante E-selectina (2 $\mu$ g/mL) nos microcanais dos biochips; (B) Duração em segundos da captura de hemácias por estes neutrófilos; \*\*P<0.01 comparado ao grupo controle, de acordo com ANOVA seguido pelo

teste de Bonferroni. Neutrófilos foram permitidos a aderir por 2 minutos ( $0,7 \text{ d/cm}^2$ ) e, em seguida, foram adicionadas hemácias em fluxo por mais 2 minutos ( $0,3 \text{ d/cm}^2$ ). Células provenientes de Controle (CON, n=10), pacientes AF (AF, n=06) e pacientes AFHU (AFHU, n=05); (C) Imagem adquirida com objetiva de magnificação de 40X, de neutrófilos aderidos a E-selectina e hemácias em fluxo e representação em maior aumento (quadrante branco – imagem ampliada em 12X) da interação neutrófilo-hemácias; seta branca apontando as hemácias. ....87

Figura 16. (A) Média da duração das interações de hemácias ( $1 \times 10^7$  /mL) por neutrófilo autólogo ( $5 \times 10^6$  /mL) aderido às proteínas recombinantes E-selectina ( $2 \mu\text{g/mL}$ ) e ICAM-1 ( $10 \mu\text{g/mL}$ ) (biochips recobertos com ambas as proteínas ICAM-1 e E-selectina); (B) Duração em segundos da captura de hemácias por estes neutrófilos; \* $P < 0.05$ , comparado ao grupo controle, de acordo com ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni. Neutrófilos foram permitidos a aderir por 2 minutos ( $0,7 \text{ d/cm}^2$ ) e, em seguida, foram adicionadas hemácias em fluxo por mais 2 minutos ( $0,3 \text{ d/cm}^2$ ). Células provenientes de Controle (CON, n=08), pacientes AF (AF, n=05) e pacientes AF em terapia com HU (AFHU, n=05). ....89

Figura 17. (A) Média do número e (B) duração de interações de hemácias ( $1 \times 10^7$  células/mL) com neutrófilos autólogos ( $5 \times 10^6$  células/mL) aderidos às proteínas recombinantes E-selectina ( $2 \mu\text{g/mL}$ ;  $n \geq 05$ ), ICAM-1 ( $10 \mu\text{g/mL}$ ;  $n \geq 05$ ), E-selectina + ICAM-1 ( $n \geq 05$ ) e HUVECs (human vein endothelial cells –  $1 \times 10^7$  células/mL;  $n \geq 09$ ), no biochip. Neutrófilos foram permitidos a aderir por 2 minutos ( $0,7 \text{ d/cm}^2$ ) e, em seguida, foram adicionadas hemácias em fluxo por mais 2 minutos ( $0,3 \text{ d/cm}^2$ ). Células provenientes de Controle (CON), pacientes AF (AF) e pacientes AF em terapia com HU (AFHU);.....91

Figura 18. (A) Porcentagem de neutrófilos (CD66b+) agregados a plaquetas (CD41a+) no sangue periférico de indivíduos saudáveis (Controle, n=12), pacientes com AF com/sem uso de HU (AF, n=15), identificados pela citometria de fluxo com imagem através da marcação com anticorpos fluorescentes contra proteínas de superfície de neutrófilos e plaquetas. \*\* $P < 0.01$ , comparado ao grupo controle, de acordo com teste de Mann-Whitney. (B) Imagens representativas de neutrófilo CD66b+ (roxo) agregado a plaquetas CD41a+ (verde) ativadas CD62P+ (amarelo); 66b/41a/62P= imagens sobrepostas (*merged*). Células provenientes de controle (CON) e paciente AF sem (AF) e com a terapia de HU (AFHU). ....93

Figura 19. Correlação do número absoluto de plaquetas com a porcentagem de agregados de neutrófilo-plaqueta presentes no sangue periférico de pacientes AF;  $R_s = 0.53$ ; \* $P < 0.05$ , correlação não-paramétrica de Spearman; n=15. ....94

Figura 20. Porcentagem de neutrófilos (CD66b+) agregados a plaquetas ativadas (CD41a+/CD62P+) no sangue periférico de indivíduos saudáveis (Controle, n=12) e pacientes com anemia falciforme com/sem uso de HU (AF, n=15), identificados pela citometria de fluxo com imagem através da marcação de anticorpos fluorescentes contra proteínas de superfície de neutrófilos e plaquetas. ....95

Figura 21. Média de intensidade de fluorescência (MFI) da molécula CD62P (P-selectina) expressa em plaquetas (CD41a+) agregadas aos neutrófilos (CD66b+) *in vitro*, de indivíduos

saudáveis (CON, n=12), pacientes com anemia falciforme sem uso de HU (AF, n=05) e pacientes com anemia falciforme em terapia com HU (AFHU, n=10). .....95

Figura 22. Porcentagem de neutrófilos agregados a plaquetas em pacientes AF (n≥05) após incubação das células com IgG1=controle isotópico, anticorpos bloqueadores de função das moléculas CD11a (LFA-1), CD11b (Mac-1), expressas em neutrófilos e anti-CD62P (P-selectina) expressa em plaquetas .....96

Figura 23. (A) Porcentagem de neutrófilos (CD16b+) agregados a células vermelhas no sangue periférico de indivíduos saudáveis (CON, n=09) e pacientes AF sem (AF, n=08) e com a terapia com HU (AFHU, n=07) brasileiros, detectada pela citometria de fluxo convencional; (B) Porcentagem de neutrófilos (CD66b+) agregados a células vermelhas no sangue periférico de indivíduos saudáveis (CON, n=11) e pacientes AF sem (AF, n=09) e com a terapia com HU (AF, n=14) americanos, detectado pela citometria de fluxo com imagem .....97

Figura 24. (A) Porcentagem de neutrófilos (CD16b+) agregados a células vermelhas no sangue periférico de indivíduos saudáveis (CON, n=09) e pacientes AF sem (AF, n=08) e com a terapia com HU (AFHU, n=07) brasileiros, detectada pela citometria de fluxo convencional; (B) Porcentagem de neutrófilos (CD66b+) agregados a células vermelhas no sangue periférico de indivíduos saudáveis (CON, n=11) e pacientes AF sem (AF, n=09) e com a terapia com HU (AF, n=14) americanos, detectado pela citometria de fluxo com imagem; #P<0.05, \*\*P<0.01, comparado ao respectivo grupo controle, de acordo com teste de *Kruskal-Wallis* seguido pelo teste de Dunn; (C) Imagens representativas em campo claro (BF) e imagens fluorescentes, adquiridas pela citometria de fluxo por imagem, de neutrófilos CD66b+ (cor roxa) agregados a reticulócitos (CD235a+ = cor amarela; CD71+ = cor verde) ou hemácias (CD235a- = cor amarela; CD71-); CD66b/CD235a/CD71= imagens sobrepostas (merged). Células provenientes do sangue periférico de controles (CON), pacientes AF sem (AF) e com terapia de HU (AFHU). .....99

Figura 25. Porcentagem de neutrófilos agregados a (A) reticulócitos ou (B) hemácias em pacientes AF após incubação das células com IgG1=controle isotópico, anticorpos bloqueadores de função das moléculas CD11a (LFA-1), CD11b (Mac-1), expressas em neutrófilos; anti-CD49d (VLA-4) expressa em reticulócitos; ICAM-4 e BCAM que são expressas em eritrócitos maduros ou imaturos; n≥12.....103

Figura 26. Porcentagem de neutrófilos agregados a (A) eritrócitos (CD235a+), (B) reticulócitos (CD235a+/CD71+) e (C) hemácias (CD235a+/CD71-) sob condições basais e após incubação do sangue periférico com anticorpo IgG não específico ou anticorpo bloqueador de função da P-selectina (n=10); Porcentagem de neutrófilos agregados a células vermelhas (D) reticulócitos (E) e hemácias (F) demonstrando a presença (+) ou não (-) de plaquetas ativadas nestes agregados heterocelulares (n= 07); \*P<0.05, \*\*P<0.01, de acordo com ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni; (G) Imagens representativas do envolvimento das plaquetas (CD62P+= cor vermelha) nos agregados de neutrófilos (CD66b+= cor roxa) a células vermelhas positivas para glicoforina A CD235a+= cor amarela) e para o receptor de transferrina = reticulócitos (CD71+ = cor verde). BF=campo claro e respectivos canais de fluorescência. ....107

Figura 27. Desenho dos microcapilares do biochip. (A) Desenho esquemático do biochip com 8 canais com 400  $\mu\text{m}$  de diâmetro e 50 $\mu\text{m}$  de profundidade cada. O canal contém um único grupo de 5 colunas de pilares. (B) Seção ampliada do microcanal (vista de cima) demonstrando a disposição dos pilares em cada microcanal. Cada coluna de pilares está espaçada entre aproximadamente 35  $\mu\text{m}$ . Cada pilar tem um diâmetro de aproximadamente 38  $\mu\text{m}$  e os espaços entre os pilares diminuem proporcionalmente em cada coluna.....109

Figura 28. Obstrução do microcanal do biochip (área de 0.186  $\mu\text{m}^2$ ) por eritrócitos de controles (CON, N=08) e pacientes AF (N=05) e pacientes AFHU (N=09). Hemácias ( $1 \times 10^7/\text{mL}$ ) foram perfundidas pelos canais incubados previamente com laminina (2  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ), a um shear stress inicial de 0,2  $\text{d}/\text{cm}^2$ , por 3 min. A obstrução foi quantificada como U. A. (unidades arbitrárias) e calculada utilizando o software AxioVision LE64 Zeiss, de acordo com descrição em materiais e métodos. ....110

Figura 29. (A) Obstrução do microcanal do biochip (área de 0.186  $\mu\text{m}^2$ ) por neutrófilos de controles (CON, N=11) e pacientes AF (N=09) e pacientes AFHU (N=06). Neutrófilos ( $5 \times 10^6/\text{mL}$ ) foram perfundidos pelos canais incubados previamente com ICAM-1 (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) e E-selectina (2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), a um shear stress inicial de 0,2  $\text{d}/\text{cm}^2$ , por 3 min. A obstrução foi quantificada como U. A. (unidades arbitrárias) e calculada utilizando o software AxioVision LE64 Zeiss. \*\*P<0.01, comparado ao grupo controle, de acordo com ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni; Imagens representativas da obstrução de neutrófilos após 3 minutos de fluxo de células de CON (B), AF (C) e AFHU (D). Imagens adquiridas pela câmera DeltaPix e com objetiva de magnificação de 20X.....111

Figura 30. (A) Quantificação da obstrução de cada coluna de pilares de acordo com os espaços laterais entre eles (40 $\mu\text{m}$  - 10 $\mu\text{m}$ ), por neutrófilos de controles (CON, N=11) e pacientes AF (N=09) e pacientes AFHU (N=06). Neutrófilos ( $5 \times 10^6/\text{mL}$ ) foram perfundidos pelos canais incubados previamente com ICAM-1 (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) e E-selectina (2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), a um shear stress inicial de 0,2  $\text{d}/\text{cm}^2$  por 3 min. A obstrução foi quantificada como U. A. (unidades arbitrárias) e calculada utilizando o software AxioVision LE64 Zeiss. \*P<0.05, comparado ao grupo controle, de acordo com ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni; (B) Imagem representativa (objetiva de 20X) da obstrução dos microcanais no momento 180 segundos por neutrófilos AF.....112

Figura 31. (A) Neutrófilos ( $5 \times 10^6/\text{mL}$ ) e células vermelhas ( $1 \times 10^7/\text{mL}$ ) de indivíduos controle (CON, N=13), pacientes AF (N=09) e pacientes AFHU (N=07) foram perfundidos em microcanais previamente incubados com laminina (2 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) a um shear stress inicial de 0,5  $\text{d}/\text{cm}^2$  por 3 min. Obstrução de cada canal foi quantificada como U. A. (unidades arbitrárias) e calculada utilizando o software AxioVision LE64 Zeiss. \*P<0.05, comparado ao grupo controle, de acordo com teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de Dunn; (B) magnificação final de 100 X e (C) 200 X.....114

Figura 32. Principais observações das interações heterocelulares de neutrófilos na Anemia Falciforme.....132



## SUMÁRIO

<i>1. INTRODUÇÃO</i> .....	31
1.1 Aspectos Gerais da Anemia Falciforme .....	33
1.1.1 Tratamento dos pacientes com anemia falciforme .....	34
1.2 Anemia falciforme como um processo inflamatório crônico .....	34
1.3 Papel dos neutrófilos no processo vaso-oclusivo da anemia falciforme .....	35
1.3.1 O recrutamento de neutrófilos no processo inflamatório .....	37
1.4 Interações heterocelulares de neutrófilos na anemia falciforme .....	39
1.4.1 Interações heterocelulares de neutrófilo-plaqueta .....	40
1.4.2 Interações heterocelulares de neutrófilo-células vermelhas .....	41
1.5. Novas tecnologias para estudo dos processos adesivos das células .....	44
<i>2. JUSTIFICATIVA</i> .....	45
<i>3. OBJETIVOS</i> .....	49
3.1 Objetivo geral .....	51
3.2 Objetivos específicos .....	51
<i>4. CASUÍSTICA E ASPECTOS ÉTICOS</i> .....	53
4.1 Casuística.....	55
4.2 Aspectos éticos da pesquisa.....	56
<i>5. METODOLOGIA</i> .....	57
5.1 Uso da plataforma microfluídica VenaFlux <sup>®</sup> para ensaios de adesão em fluxo e avaliação de interações heterocelulares <i>in vitro</i> .....	59
5.1.1 Separação de neutrófilos.....	59
5.1.2 Separação de plaquetas .....	60
5.1.3 Separação de células vermelhas .....	60
5.1.4 Cultivo de células endoteliais HUVECs.....	61

5.1.5 Preparo dos biochips Vena8Fluoro+ e Vena8Endothelial+ .....	61
5.1.6 Reagentes e proteínas recombinantes utilizados na plataforma microfluídica.....	62
5.1.7 Avaliação das interações heterocelulares de neutrófilos na plataforma microfluídica .	63
5.1.8 Desenvolvimento de um novo biochip para estudo dos processos vaso-oclusivos.....	64
5.2 ImageStreamX MKII - Citometria de fluxo com imagem para identificação de agregados heterocelulares de neutrófilos <i>in vitro</i> .....	64
5.2.1 Preparo da citometria de fluxo e marcação com anticorpos fluorescentes.....	65
5.2.2 Uso de anticorpos bloqueadores de função para identificação das moléculas envolvidas nos agregados heterocelulares .....	65
5.2.3 Análise e interpretação dos resultados.....	66
5.3 Análise estatística .....	67
<b>6.RESULTADOS</b> .....	<b>69</b>
6.1 Subprojeto 1: Avaliação das interações heterotípicas de neutrófilos previamente aderidos, pelo uso da plataforma microfluídica .....	71
6.1.1 Padronização do uso da plataforma microfluídica para avaliação da adesão e interações celulares .....	72
6.1.2 Adesão em fluxo <i>in vitro</i> de neutrófilos de indivíduos saudáveis e pacientes com anemia falciforme.....	72
6.1.3 Adesão em fluxo <i>in vitro</i> de plaquetas de indivíduos saudáveis e pacientes com anemia falciforme.....	73
6.1.4 Avaliação das interações heterotípicas de neutrófilos e plaquetas de indivíduos saudáveis e pacientes com anemia falciforme.....	74
6.1.5 A influência da presença de plaquetas aderidas nos microcanais na adesão de neutrófilos ao fibrinogênio.....	77
6.1.6 Interação de células vermelhas a neutrófilos previamente aderidos a fibronectina .....	78
6.1.7 Padronização da adesão em fluxo de neutrófilos a células endoteliais HUVECs .....	79
6.1.8 Interação de células vermelhas a neutrófilos previamente aderidos a células endoteliais HUVECs.....	81
6.1.9 Adesão em fluxo <i>in vitro</i> de células vermelhas à laminina .....	82

6.1.10 Avaliação do papel das hemácias na ocorrência das interações neutrófilo-hemácia ..	83
6.1.11 Interação de células vermelhas a neutrófilos previamente aderidos à proteína ICAM-1 ou E-selectina .....	84
6.1.12 Interação de células vermelhas a neutrófilos previamente aderidos às proteínas ICAM-1 e E-selectina.....	88
6.1.13 Resumo das interações de células vermelhas com neutrófilos aderidos a diferentes ligantes e a células endoteliais HUVECs .....	90
6.2 Subprojeto 2: Avaliação dos agregados heterocelulares circulantes de neutrófilos no sangue periférico, utilizando a tecnologia de citometria de fluxo com imagem .....	92
6.2.1 Porcentagem de agregados heterocelulares de neutrófilo-plaqueta <i>in vitro</i> no sangue periférico de controles e pacientes AF .....	93
6.2.2 Agregados heterocelulares de neutrófilos a plaquetas ativadas (CD62P+) e a expressão de P-selectina na superfície das plaquetas agregadas .....	94
6.2.3 Identificação das moléculas de adesão envolvidas nos agregados de neutrófilo-plaqueta em pacientes AF .....	96
6.2.4 Porcentagem de agregados heterocelulares de neutrófilo-células vermelhas <i>in vitro</i> no sangue periférico de controles e pacientes AF .....	97
6.2.5 Identificação das células vermelhas presentes nos agregados heterocelulares de neutrófilo-células vermelhas.....	98
6.2.6 Expressão das integrinas $\beta_2$ : LFA-1 (CD11a), Mac-1 (CD11b) e da proteína CD66b na superfície de neutrófilos .....	100
6.2.7 Identificação das moléculas de adesão envolvidas nos agregados de neutrófilo-células vermelhas em pacientes AF.....	102
6.2.8 Correlação da porcentagem de agregados de neutrófilo-células vermelhas encontrados no sangue periférico de pacientes AF.....	104
6.2.9 Investigação do papel das plaquetas na formação de agregados heterocelulares de neutrófilo-células vermelhas no sangue periférico de pacientes AF .....	106
6.3 Subprojeto 3: Desenvolvimento de um biochip para estudo dos processos vaso-oclusivos utilizando a plataforma microfluídica VenaFlux .....	108
6.3.1 Obstrução dos microcanais do biochip com eritrócitos isolados de controles e pacientes AF .....	109

6.3.2 Obstrução dos microcanais do biochip com neutrófilos isolados de controles e pacientes AF .....	110
6.3.3 Avaliação da obstrução dos microcanais do biochip por neutrófilos e eritrócitos dispensados juntamente nestes canais .....	113
<i>7.DISSCUSSÃO</i> .....	115
7.1 Subprojeto 1: Avaliação das interações heterotípicas de neutrófilos aderidos pelo uso da plataforma microfluídica .....	117
7.2 Subprojeto 2: Avaliação dos agregados heterocelulares circulantes de neutrófilos no sangue periférico, utilizando a tecnologia de citometria de fluxo com imagem .....	121
7.3 Subprojeto 3: Desenvolvimento de um biochip para estudo dos processos vaso-oclusivos utilizando a plataforma microfluídica VenaFlux .....	126
<i>8. CONCLUSÕES</i> .....	129
<i>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</i> .....	133
<i>ANEXOS</i> .....	145
<i>APÊNDICE</i> .....	149





# *1. INTRODUÇÃO*



# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 Aspectos Gerais da Anemia Falciforme

A anemia falciforme (AF) é uma hemoglobinopatia hereditária que resulta de uma mutação de ponto no gene da globina beta. Essa mutação leva à substituição do ácido glutâmico por uma valina na sexta posição dessa cadeia, levando à formação de uma hemoglobina com propriedades físico-químicas anormais, conhecida como hemoglobina S (HbS) (Stuart e Nagel, 2004). Com a desoxigenação das hemácias, as moléculas de HbS sofrem agregação e polimerização. Após esse processo, a hemoglobina que se apresentava na forma de um líquido de fluxo livre passa a ter o aspecto de um gel viscoso, resultando na deformação dos eritrócitos, que adquirem o formato de foice (Cotran *et al.*, 2000). A mutação no gene da hemoglobina compreende a base molecular da anemia falciforme, mas a evolução clínica correspondente a esta doença é complexa, afetando vários órgãos, como os rins, baço e pulmão. Pacientes com AF sofrem com uma anemia hemolítica severa, crises vaso-oclusivas, além de uma disfunção crônica dos órgãos (Rees *et al.*, 2010).

O termo anemia falciforme refere-se especificamente à homozigose do alelo  $\beta^S$ , a forma mais comum da doença falciforme, e a doença falciforme compreende a todos os diferentes genótipos que causam a síndrome clínica característica. Em populações de origem étnica africana a anemia falciforme geralmente é responsável por 70% dos casos de doença falciforme, sendo a maioria do restante dos casos doença da hemoglobina SC (doença falciforme SC). Essa variante da doença falciforme resulta da co-hereditariedade dos alelos  $\beta^S$  e  $\beta^C$  e possui uma gravidade clínica intermediária (Nagel *et al.*, 2003). Devido ao perfil étnico da população brasileira, a incidência da doença falciforme varia de 1 em cada 650 a 4 mil nascimentos. Nos estados com maior concentração de afro descendentes a prevalência desta doença é mais alta, se tornando um grave problema de saúde pública no Brasil (Portal da Saúde – Triagem Neonatal - [http://portal.saude.gov.br/portal/saude/area.cfm?id\\_area=1061](http://portal.saude.gov.br/portal/saude/area.cfm?id_area=1061)).

### **1.1.1 Tratamento dos pacientes com anemia falciforme**

Atualmente a única terapia aprovada pelo FDA (*Food and Drug Administration*) para tratamento dos pacientes com AF é a hidroxiureia (HU). Esta droga reduz a concentração da HbS e falcização das células vermelhas por aumentar os níveis de HbF (Noguchi *et al.*, 1988; Ware, 2013). A HU é um agente quimioterápico que vem sendo amplamente utilizado no tratamento da doença falciforme devido ao seu baixo efeito tóxico (Platt *et al.*, 1984) e também por diminuir a frequência das crises vaso-oclusivas, a síndrome torácica aguda e diminuição da necessidade de transfusão sanguínea (Charache *et al.*, 1995; Maier-Redelsperger *et al.*, 1999). Com o tempo, vários outros efeitos benéficos foram sendo atribuídos a essa droga, incluindo a diminuição da contagem de plaquetas e leucócitos, a diminuição da ativação do endotélio (Castro *et al.*, 1994; Rogers, 1997; Odièvre *et al.*, 2007; Colella *et al.*, 2012), mudanças na expressão de moléculas de adesão (Covas *et al.*, 2004; Gambero *et al.*, 2007; Canalli *et al.*, 2008) e a geração de óxido nítrico (Lou *et al.*, 2009). Em geral, a hidroxiureia é bem tolerada e seu principal efeito colateral, em curto prazo, é uma mielossupressão dose dependente, todavia muitos pacientes não respondem ao tratamento (Lankron *et al.*, 2008).

Adicionalmente, o transplante alogênico de células-tronco da medula óssea ou de sangue de cordão umbilical é uma terapia potencialmente curativa, embora apenas uma pequena porcentagem dos pacientes seja submetida a esse procedimento, a maioria são crianças com sintomas graves que possuem doadores irmãos HLA-compatíveis. Contudo, o transplante de células alogênicas acarreta o risco da doença do enxerto-versus-hospedeiro (GVHD), que pode ser causa de elevada morbidade (Rees *et al.*, 2010; Shenoy, 2011; Romero *et al.*, 2013).

### **1.2 Anemia falciforme como um processo inflamatório crônico**

A AF é considerada uma doença inflamatória crônica (Hagar e Vichinsk, 2008), sendo evidenciada pela contagem elevada de leucócitos (Steinberg e Mohandas, 1994), além da ativação anormal de granulócitos e monócitos (Fadlon *et al.*, 1998; Lard *et al.*, 1999; Belcher *et al.*, 2000; Inwald *et al.*, 2000). A leucocitose na AF é um fator de risco

para mortalidade e para complicações como síndrome torácica aguda, acidente vascular cerebral e choque hemorrágico (Balkaran *et al.*, 1992; Castro *et al.*, 1994; Platt *et al.*, 1994; Ohene-Frempong *et al.*, 1998; Kinney *et al.*, 1999).

Várias características típicas da biologia da inflamação ocorrem na anemia falciforme, como ativação da cascata de coagulação, níveis elevados de molécula de adesão vascular (VCAM) solúvel e, algumas vezes, contagem elevada de plaquetas (Francis e Hebbel, 1994; Duits *et al.*, 1996). Além disso, os níveis de alguns mediadores inflamatórios encontram-se elevados na AF, como por exemplo, fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), interleucina 6 (IL-6), interleucina 1 beta (IL-1  $\beta$ ) e interleucina 8 (IL-8) (Hagar e Vichinsk, 2008, Lanaro *et al.*, 2009). Os níveis de proteína C reativa (PCR) são frequentemente usados como marcador geral de inflamação sistêmica em pacientes com AF, enquanto a nível molecular, os níveis de IL-6 ou interleucina 10 (IL-10, citocina anti-inflamatória) representam medidas mais confiáveis da elevação da atividade inflamatória nos pacientes AF (Hebbel *et al.*, 2004; Lanaro *et al.*, 2009).

Em geral, os pacientes apresentam um quadro de hemólise intravascular crônica que pode induzir a inflamação, a disfunção endotelial, o estresse oxidativo, dentre outros efeitos (Belcher *et al.*, 2005; Kato *et al.*, 2009). Além disso, as hemácias falcizadas rígidas podem também danificar a parede vascular e, uma vez ativado, o endotélio pode aumentar a expressão de moléculas de adesão em sua superfície, conseqüentemente aumentando a adesão de células sanguíneas à parede do vaso. A produção contínua de citocinas, quimiocinas e outros mediadores inflamatórios pelo endotélio e células inflamatórias, perpetua o estado inflamatório crônico na AF e especula-se que estes eventos tenham papel iniciador no processo vaso-oclusivo (Hebbel *et al.*, 2004; Assis *et al.*, 2005; Canalli *et al.*, 2008; Conran *et al.*, 2009).

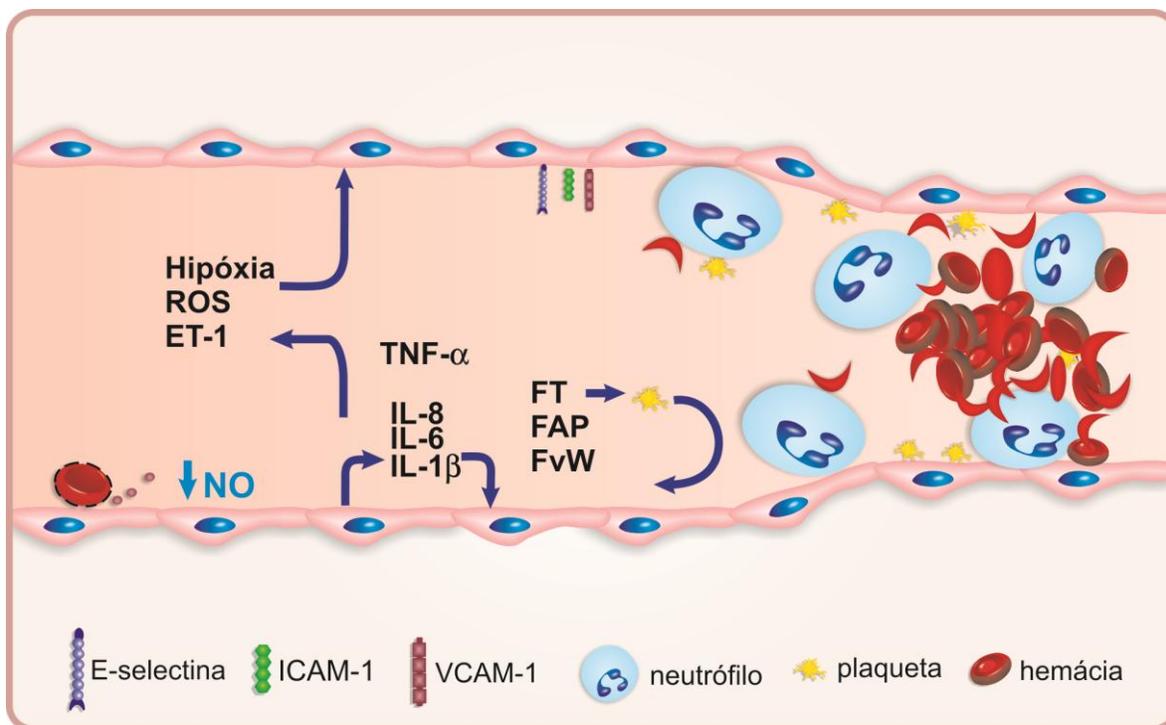
### 1.3 Papel dos neutrófilos no processo vaso-oclusivo da anemia falciforme

As crises vaso-oclusivas são a principal complicação aguda e a principal causa de morbidade da doença falciforme. A vaso-oclusão compreende um processo multicelular que parece ser iniciado pela adesão de hemácias e leucócitos ao endotélio ativado, causando

a obstrução dos vasos e isquemia tecidual. Embora esse processo necessite da polimerização da HbS, o evento que desencadeia essa obstrução é muitas vezes inflamatório (Hebbel *et al.*, 1980; Frenette, 2002; Turhan *et al.*, 2002).

A adesão de hemácias falciformes à parede vascular contribui para a redução do fluxo sanguíneo e, eventualmente, pode levar à vaso-oclusão. Contudo, a adesão de leucócitos também parece ter um papel fundamental neste processo, pois são células grandes (12-15 $\mu$ m), rígidas e seu recrutamento para o endotélio microvascular e subsequente interação com as células circulantes sanguíneas reduz o fluxo sanguíneo nos vasos, o que pode iniciar o processo vaso-oclusivo (Turhan *et al.*, 2002; Turhan *et al.*, 2004; Conran e Costa, 2009; Hidalgo *et al.*, 2009; Chaar *et al.*, 2010).

Leucócitos aderidos ao lúmen vascular podem alterar o fluxo sanguíneo, principalmente em vênulas de pequeno diâmetro; e durante a inflamação, mais neutrófilos podem ser recrutados, levando a obstrução do fluxo (Scheiermann *et al.*, 2010). No cenário inflamatório da AF, dados de estudos em modelos animais *in vivo* indicam que o recrutamento de leucócitos, particularmente os neutrófilos, à parede do vaso pode promover interações subsequentes com células vermelhas circulantes sanguíneas (Turhan *et al.*, 2002; Turhan *et al.*, 2004; Hidalgo *et al.*, 2009). Sugere-se que esta adesão secundária de células vermelhas a leucócitos aderidos desempenhe um papel primordial na propagação e iniciação do processo vaso-oclusivo (Natcher e Hidalgo, 2011; Manwani e Frenette, 2013).



**Figura 1. Mecanismo de vaso-oclusão na anemia falciforme. Costa *et al.*, 2013.** O contato direto das hemácias SS e a presença de hemólise intravascular levam à ativação das células endoteliais que revestem o vaso; a presença do heme livre na circulação tem efeito deletério no vaso e ainda consome o óxido nítrico (NO) sintetizado pelas células endoteliais. Juntamente com a presença de Espécies Reativas de Oxigênio (ROS), a hipóxia e os vasoconstritores como Endotelina-1 (ET-1), esses mecanismos contribuem para a ativação das células endoteliais. O estado de hipercoagulabilidade leva a níveis aumentados de Fator Tecidual (FT), Fator ativador de plaquetas (FAP), Fator de Von Willebrand (FvW) e ativação plaquetária. A ativação do endotélio também conta com a presença das plaquetas ativadas no vaso sanguíneo e a sua adesão à parede vascular. Após sua ativação, as células endoteliais aumentam a expressão das moléculas de adesão (como ICAM-1, VCAM-1 e E-selectina) na superfície do vaso e também liberam mais citocinas e quimiocinas como o IL-8, IL-6 e IL-1 $\beta$ , que com o TNF- $\alpha$ , contribuem para a inflamação vascular e a ativação das células sanguíneas. Os leucócitos e as hemácias aderem à parede vascular devido à sua ativação e expressão de moléculas de adesão e, também, podem haver interações heterotípicas entre leucócitos aderidos e hemácias. A vasoconstrição elevada e a obstrução física do vaso ocasionam uma redução no fluxo sanguíneo com conseqüente hipóxia e falcização das hemácias, dificultando a passagem de sangue, e finalmente na vaso-oclusão.

### **1.3.1 O recrutamento de neutrófilos no processo inflamatório**

Os neutrófilos correspondem a 70% das células de defesa nos seres humanos e possuem uma meia vida curta (6-8h) na circulação periférica. Estas células participam da resposta primária a inflamação aguda e chegam ao local de inflamação por deixar a circulação, aderir ao endotélio vascular ativado, migrando em direção ao tecido inflamado

(Cascão *et al.*, 2010; Natcher e Hidalgo, 2011). O recrutamento destas células para o local da inflamação é iniciado por sua captura e, em seguida, rolamento ao longo das vênulas nos leitos vasculares periféricos e isto é mediado primeiramente pelas selectinas, que são constituídas de três tipos, L, E e P- selectinas (Issekutz, 1998; Hidalgo *et al.*, 2007). A L-selectina é expressa na ponta das microvilosidades dos leucócitos e está envolvida na adesão destas células ao endotélio, a P-selectina está estocada em plaquetas ativadas e células endoteliais e se torna rapidamente expressa na superfície após estímulo, intermediando o rolamento leucocitário nas primeiras horas após sinais inflamatórios. Já a expressão de E-selectina é restrita ao endotélio e induzida por sinais de citocinas inflamatórias como TNF- $\alpha$  e IL-1, promovendo o rolamento lento de leucócitos em vênulas inflamadas (Tarrant e Patel, 2006; Hidalgo *et al.*, 2007; Ley *et al.*, 2007).

Após o rolamento inicial dos leucócitos, as integrinas das células tornam-se ativadas, levando a uma adesão firme dos leucócitos com o intuito de resistir ao descolamento provocado pelo fluxo sanguíneo (Alon e Feigelson, 2002; Long *et al.*, 2004). As integrinas são receptores heterodímeros presentes na superfície de leucócitos, consistindo de cadeias alfa ( $\alpha$ ) e beta ( $\beta$ ) com grandes domínios de ligação extracelulares e encurtados domínios citoplasmáticos. As mais relevantes para a migração leucocitária são a família das  $\beta_2$  integrinas, compreendendo as integrinas LFA-1 (*antígeno -1 associado à função linfocitária*; CD11a/CD18) e Mac-1 (*antígeno de macrófago 1*; CD11b/CD18). Estas moléculas são usualmente encontradas em um estado inativo em leucócitos e não são capazes de ligar aos seus ligantes, mas tornam-se adesivas após estímulos ativadores (Hilden *et al.*, 2006; Tarrant e Patel, 2006).

Em seguida, os leucócitos migram por diapedese através da monocamada endotelial e da membrana basal para os tecidos. Este processo é complexo e pouco compreendido e envolve extensos mecanismos moleculares. Após esta migração transendotelial e extravasamento dentro dos tecidos, o leucócito deve receber novos sinais, frequentemente na forma de gradientes de quimiocinas, para continuar o processo de recrutamento para o local de inflamação (Tarrant e Patel, 2006; Lorenowicz *et al.*, 2007), evitando assim, a propagação da infecção enquanto uma resposta imune é montada (Scheiermann *et al.*, 2010). Cessado o estímulo inflamatório, há uma necessidade urgente de reparo da lesão e o retorno ao estado homeostático, portanto, defeitos na função neutrofílica, frequentemente,

resultam em uma resposta inflamatória anormal gerando danos vasculares ou nos órgãos (Cascão *et al.*, 2010).

#### 1.4 Interações heterocelulares de neutrófilos na anemia falciforme

Ao aderir ao endotélio vascular, o neutrófilo fica em uma posição estratégica que permite que ele integre sinais entre as células endoteliais ativadas e as células circulantes sanguíneas (Scheiermann *et al.*, 2010). A fisiopatologia do processo vaso-oclusivo na anemia falciforme abrange uma variedade de interações adesivas entre células vermelhas, leucócitos, endotélio e plaquetas e investigações nesta dinâmica de interações heterocelulares são áreas potencialmente atrativas para pesquisa, pois elas contribuem para o desenvolvimento de novos alvos terapêuticos e pela melhora do quadro inflamatório nos pacientes com AF (Telen, 2014). Estudos por microscopia intravital, em modelos de camundongos transgênicos para a anemia falciforme, revelaram que a adesão de leucócitos em vênulas exerce um papel fundamental no processo de vaso-oclusão por interagir com hemácias falcizadas e não falcizadas (Turhan *et al.*, 2002; Chang *et al.*, 2008; Hidalgo *et al.*, 2009; Almeida *et al.*, 2012). Contudo, o mecanismo pelo qual as hemácias aderem aos neutrófilos ainda não foi elucidado.

Hidalgo e colaboradores (2009) forneceram evidências de interações celulares de neutrófilos e hemácias e neutrófilos e plaquetas na microcirculação sistêmica de camundongos após estímulo inflamatório. Estes agregados foram responsáveis por lesão tecidual e o bloqueio das interações neutrófilo-plaqueta através da inibição da função da P-selectina protegeu o camundongo desta inflamação endotelial. Outros pesquisadores avaliaram subpopulações de leucócitos (monócitos, linfócitos e neutrófilos) de pacientes com anemia falciforme, observando a capacidade destes leucócitos aderentes de capturarem hemácias falcizadas, utilizando um modelo de fluxo *in vitro* (Finnegan *et al.*, 2007).

Pesquisas recentes têm demonstrado um papel proeminente dos neutrófilos no início e progressão da aterosclerose, como também já foram descritos papéis em outras situações em que ocorre disfunção endotelial como, por exemplo, em complicações cardiovasculares, como hipercolesterolemia, hipertensão arterial, lesão de isquemia e reperfusão, dentre outras condições inflamatórias intravasculares (Kaneider *et al.*, 2002; Baetta e Corsini,

2010). Nestes trabalhos foram observadas que interações diretas de neutrófilos e plaquetas, mediadas por P-selectina na superfície da plaqueta, representam um primeiro passo na formação de um trombo leucocítico-plaquetário *in vivo* relacionado à formação de placas ateromatosas (Kaneider *et al.*, 2002).

#### **1.4.1 Interações heterocelulares de neutrófilo-plaqueta**

Vários estudos têm demonstrado que as interações físicas de neutrófilos e plaquetas podem aumentar a resposta inflamatória e, conseqüentemente, levar a danos vasculares (Clark *et al.*, 2007; Zarbock *et al.*, 2007). Estudos *in vitro* demonstraram que a ligação de plaquetas lavadas ativadas à neutrófilos em suspensão resultou na ativação destas células (Ott *et al.*, 1996; Kogaki *et al.*, 1999) e estudos *in vivo* relataram o aumento da formação de agregados neutrófilo-plaqueta como resultado de processos inflamatórios (Gawaz *et al.*, 1995; Kirschenbaum *et al.*, 2002, Li *et al.*, 2014).

A formação de agregados neutrófilo-plaquetas é bem conhecida em condições inflamatórias como sepse, aterosclerose e é sugerido que estes agregados podem contribuir para a inflamação vascular e lesão tecidual que ocorre na AF (Nash, 1994; Gawaz, 1995; Kirschenbaum, *et al.*, 2002; May *et al.*, 2007; Polanowska-Grabowska *et al.* 2010; Jakubowski *et al.*, 2014; Li *et al.*, 2014). Um estudo avaliando a formação dos agregados de plaqueta-neutrófilo em pacientes com AF (Polanowska-Grabowska *et al.*, 2010) encontrou evidências de que estas interações estão aumentadas nestes pacientes comparados a indivíduos saudáveis e que a P-selectina, expressa na superfície de plaquetas quando ativadas, pode estar envolvida nestas interações. Além disso, a ativação plaquetária pode levar a um aumento da disfunção endotelial e alterações na liberação de fatores pró-inflamatórios promovendo o recrutamento de neutrófilos e monócitos e, conseqüentemente, sua interação a estas células (Garrido *et al.*, 2012; Proença-Ferreira *et al.*, 2014). Estudos recentes tem despertado interesse na resposta inflamatória dos neutrófilos, mediada pela produção de NETs (*neutrophil extracellular traps*), que são redes de cromatina que atuam na resposta inflamatória neutrofílica. Dados indicam que interações com plaquetas são necessárias para a produção destas redes (McDonald *et al.*, 2012). Mais recentemente foi

observado que esta produção de redes (NETs) por neutrófilos estão aparentemente aumentadas na AF (Cheng *et al.*, 2014).

As interações de leucócitos e plaquetas podem também ser encontradas em outras condições caracterizadas por inflamação vascular, como TRALI (lesão pulmonar aguda relacionada à transfusão), doença arterial coronariana e em tecidos adiposos de obesos (Furman *et al.*, 1998; Nishimura *et al.*, 2008; Hidalgo *et al.*, 2009; Polanowska-Grabowska *et al.*, 2010). Estas interações, além de refletir o estado ativado das plaquetas e leucócitos nestas doenças, têm um papel na exacerbação da inflamação, acelerando o rolamento dos leucócitos e aumentando a produção de quimiocinas e citocinas na imunidade (von Hundelshausen *et al.*, 2009).

Evidências indicam que interações de neutrófilos e plaquetas são mediadas pela P-selectina (CD62P) nas plaquetas e seu ligante PSGL-1 (ligante 1 da glicoproteína P-selectina) nos neutrófilos, representando potenciais alvos terapêuticos na prevenção da formação de trombos em doenças inflamatórias vasculares (Konstantopoulos *et al.*, 1998; Yang J *et al.*, 1999; Zarbock *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2014).

#### **1.4.2 Interações heterocelulares de neutrófilo-células vermelhas**

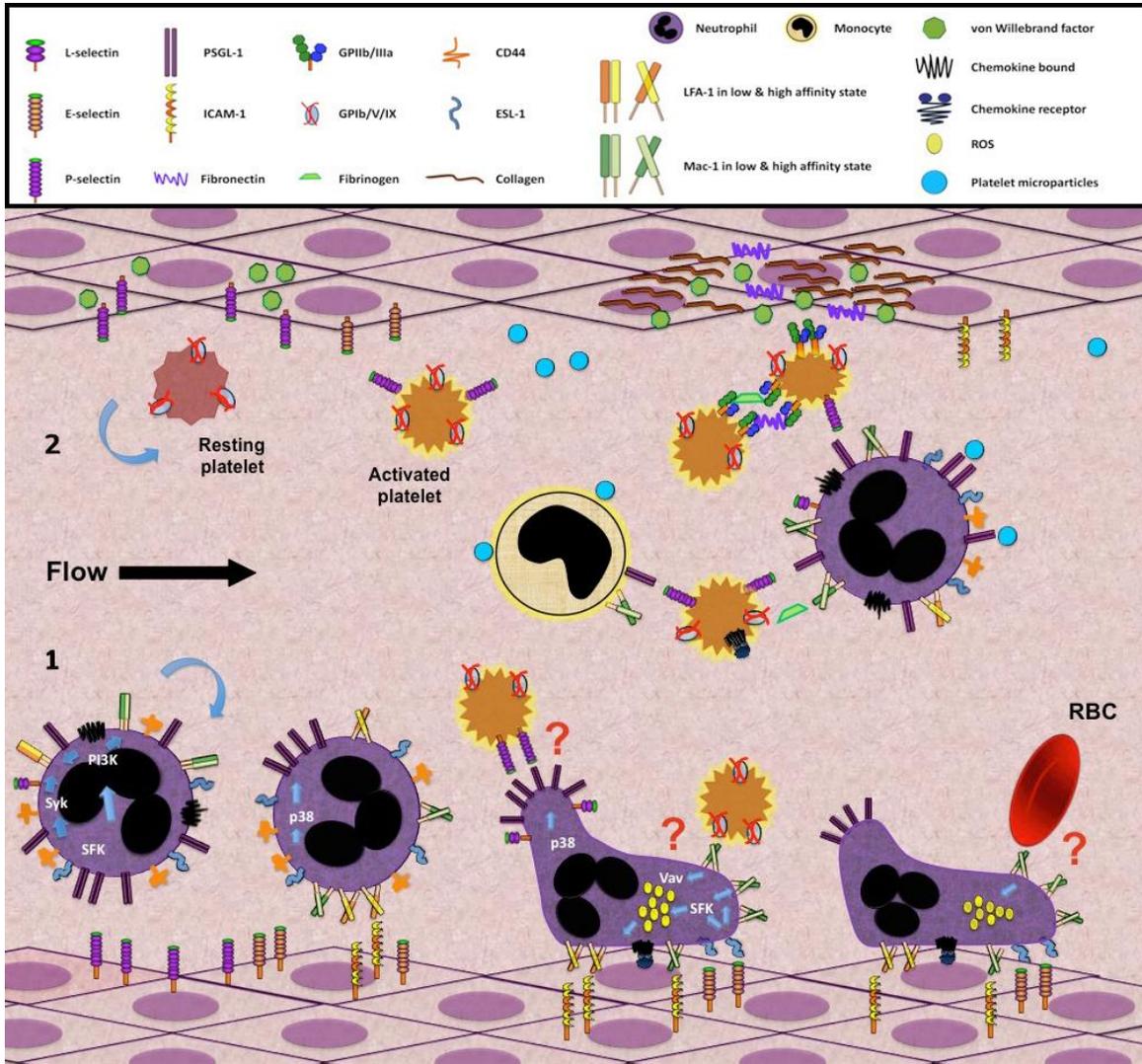
A formação de agregados neutrófilo-hemácias não é bem elucidada. Acredita-se que as interações adesivas de eritrócitos com neutrófilos aderentes ativados possam levar a vaso-oclusão, em condições de baixo fluxo (Goel e Diamond, 2002). Experimentos *in vitro*, destacaram a presença de agregados de células circulantes vermelhas a células mononucleares em pacientes com AF, e o tratamento com HU reduziu a formação destes agregados (Chaar *et al.*, 2010), enquanto a fibronectina foi relatada como a ponte de ligação de monócitos a reticulócitos na AF (Brittain *et al.*, 2008). Em outro estudo *in vitro* (Zennadi *et al.*, 2008), hemácias de indivíduos AF foram incubadas com uma mistura de linfócitos e monócitos e observaram que estes leucócitos se tornaram mais adesivos ao endotélio.

Em modelos de camundongos falciformes, as interações de hemácias com neutrófilos estavam aumentadas e foram responsáveis por uma vaso-oclusão que levou à morte destes animais (Chang *et al.*, 2008; Turhan *et al.*, 2004; Hidalgo *et al.*, 2009) e a

infusão de imunoglobulina intravenosa foi capaz de prevenir a vaso-oclusão nestes camundongos.

Os ligantes envolvidos nas interações de neutrófilos com hemácias ainda não foram identificados, mas moléculas como a molécula de adesão intercelular 4 (ICAM-4) e a proteína C3 do complemento nas hemácias parecem estar envolvidas (Kaneider *et al.*, 2002; Zennadi *et al.*, 2008; Hidalgo *et al.*, 2009). Receptores de adesão na membrana eritroide, como ICAM-4 (Landsteiner-Weiner) e molécula de adesão celular basal/ grupo sanguíneo Lutheran (BCAM/Lu), podem se ligar a diversos ligantes celulares, incluindo integrinas ou não-integrinas. ICAM-4 liga-se às integrinas  $\beta 1$  e  $\beta 2$  expressas em leucócitos (Bailly *et al.*, 1995; Hermand *et al.*, 2000), à integrina  $\alpha \nu \beta 3$  de células endoteliais (Zennadi *et al.*, 2004) e à integrina  $\alpha \text{IIb} \beta 3$  de plaquetas (Hermand *et al.*, 2003). Em um estudo que avaliou as moléculas de adesão envolvidas nas interações de hemácias com células mononucleares (Chaar *et al.*, 2010), foi observado que as moléculas BCAM/Lu e antígeno de expressão tardia 4 (VLA-4), esta última expressa em reticulócitos, podem estar envolvidas nestas interações.

Nos neutrófilos, as moléculas possivelmente envolvidas nas interações neutrófilo-hemácias são às  $\beta 2$  integrinas LFA-1 e Mac-1 (Goel e Diamond, 2002; Hidalgo *et al.*, 2009; Scheiermann *et al.*, 2010). Além disso, a molécula cluster de diferenciação 66 b (CD66b) demonstrou ter um papel importante em mediar interações homotípicas e auxiliar a ação da integrina Mac-1 (Schmidt *et al.*, 2012). A identificação dos receptores responsáveis por estas interações heterotípicas de neutrófilos pode contribuir para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas que previnam a formação destes agregados nas condições inflamatórias vasculares, visto que a presença destas interações participa de forma significativa para o agravamento das complicações clínicas.



**Figura 2. Dinâmica da interação de leucócitos às plaquetas e células vermelhas. Hidalgo *et al.*, 2009 (traduzido)** **1. Interação de leucócitos e formação dos microdomínios.** Neutrófilos rolam sobre as P- e E- selectinas e os seus ligantes PSGL-1, CD44 e ESL-1. Estas interações induzem a atividade de membros da família das Src quinases (SFK) e ativam parcialmente as integrinas LFA-1 e Mac-1. CD44 e ESL-1 medeiam o rolamento lento, resultando na ativação do neutrófilo que leva à polarização de moléculas da borda posterior à borda anterior desta célula. A presença de receptores de adesão ativados em leucócitos intravasculares permite interações com diferentes componentes do sangue. Em células polarizadas, as interações com plaquetas são supostamente mediadas por PSGL-1 na borda posterior e por Mac-1 na borda anterior. A borda anterior também medeia interações com células vermelhas circulantes. Os ligantes nas plaquetas e nos eritrócitos que participam destas interações ainda não foram identificados. Como resultado destas interações, sinais de fora para dentro são transmitidos pelas integrinas, que ativam ainda mais os neutrófilos aderidos e promovem a liberação de espécies reativas de oxigênio (ROS). **2. Interações de plaquetas.** Plaquetas ativadas ou em estado basal rolam sobre o endotélio ativado ou estimulado podendo aderir firmemente. Plaquetas em estado basal expressam GPII $\alpha$  e PSGL-1 que interagem ao fator de vonWillebrand (vWf) e P-selectina expressas no endotélio, respectivamente. Durante a inflamação, fibrinogênio ou fibrina promove a agregação de plaquetas ativadas ou adesão destas ao endotélio através da sinalização de GPIIb/IIIa. Plaquetas aderidas promovem recrutamento de leucócitos através da P-selectina e podem exacerbar estados patológicos. A ligação a leucócitos na circulação é mediada pela P-selectina e GPII $\alpha$ , pares de receptores/ligantes não caracterizados.

### 1.5. Novas tecnologias para estudo dos processos adesivos das células

O campo da tecnologia de microfluidos tem despertado o interesse na área biomédica, pois esta tecnologia realiza experimentos *in vitro* com configurações que são suficientemente simples para serem utilizadas na prática laboratorial diária, além de serem necessárias menores quantidades de células e reagentes, e permitirem levar a uma maior compreensão da fisiopatologia celular (Van der Meer *et al.*, 2009).

Plataformas microfluídicas fornecem um ensaio celular baseado em situações fisiológicas de fluxo contínuo, realizando ensaios *in vitro* que mimetizam situações *in vivo* que ocorrem no fluxo sanguíneo, reproduzindo de forma mais fidedigna estes mecanismos. Entretanto, ensaios microfluidicos tradicionais, tais como placas com canais paralelos, não reproduzem com precisão a geometria e bifurcações encontradas *in vivo* na microvasculatura e apenas mimetizam o fluxo em vasos com calibres maiores.

Avanços também vêm sendo feitos na microscopia ótica e de fluorescência, em que a melhora das aquisições de imagens por câmeras acopladas a estes microscópios, fazem com que a qualidade e tempo de aquisição dessas imagens seja cada vez mais eficiente e realista. Com isso, o uso de tecnologias modernas de imagem possibilita a visualização das interações celulares adesivas e estudos recentes tem focado na investigação de agregados celulares homotípicos ou heterotípicos que podem estar presentes no sangue periférico em diversas patologias e as consequências provocadas pela existência deles.

## *2. JUSTIFICATIVA*

---



## 2. JUSTIFICATIVA

Os neutrófilos exercem uma função importante em diversas condições inflamatórias e na anemia falciforme parecem ter papel iniciador no processo vaso-oclusivo. Entretanto, as interações adesivas destas células com outros tipos celulares não estão totalmente elucidadas. Muito pouco se sabe sobre a presença de agregados circulantes de neutrófilos no sangue periférico e se estes agregados podem contribuir para a obstrução do fluxo em vênulas de pequeno calibre.

Diante disso, estudar a formação de interações heterotípicas de neutrófilos com outras células circulantes ou aderentes e as moléculas de adesão celular envolvidas nestas interações, utilizando tecnologia de microfluidos, que mimetiza de forma mais realística as condições encontradas *in vivo*, torna-se de grande interesse para o desenvolvimento de abordagens para prevenir o processo vaso-oclusivo em pacientes com anemia falciforme e na melhora do quadro de inflamação vascular encontrado em outras condições inflamatórias.



### *3. OBJETIVOS*

---



### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo geral**

Estudar as interações heterotípicas dos neutrófilos com plaquetas, células vermelhas e células endoteliais em pacientes com anemia falciforme (um modelo de doença inflamatória crônica vascular) e as moléculas de adesão celular envolvidas nestas interações utilizando, entre outras técnicas, a plataforma microfluídica Cellix VenaFlux que mimetiza o mecanismo de adesão celular sob fluxo *in vitro*.

#### **3.2 Objetivos específicos**

Três subprojetos foram desenvolvidos:

- 1) Estudar as interações heterotípicas de neutrófilos previamente aderidos (a células endoteliais ou ligantes endoteliais), com plaquetas ou hemácias e observar as moléculas de adesão celular envolvidas nestas interações utilizando células provenientes de indivíduos saudáveis e de pacientes com AF;
- 2) Verificar a presença de agregados circulantes de neutrófilo-células vermelhas e neutrófilo-plaquetas no sangue periférico obtido de pacientes AF e de indivíduos saudáveis, além de investigar as moléculas de adesão envolvidas nestas interações;
- 3) Desenvolver um novo biochip para ser utilizado na plataforma microfluídica Cellix VenaFlux, para estudos dos processos vaso-oclusivos.



## *4. CASUÍSTICA E ASPECTOS ÉTICOS*



## **4. CASUÍSTICA E ASPECTOS ÉTICOS**

### 4.1 Casuística

#### **Subprojetos 1 e 3:**

Para o grupo controle foram recrutados indivíduos saudáveis, que compreenderam alunos, funcionários e doadores de sangue do hemocentro da UNICAMP ou indivíduos voluntários à pesquisa. Os pacientes com anemia falciforme (em terapia ou não com hidroxiureia) foram recrutados do Ambulatório de Hemoglobinopatias do Hemocentro da UNICAMP (Ver Tabela 1 para dados clínicos e demográficos para estes pacientes).

#### **Subprojeto 2:**

Neste projeto, o grupo controle compreendeu funcionários (indivíduos saudáveis) do National Heart, Lung and Blood Institute-NHLBI, um departamento do National Institutes of Health (NIH, Bethesda, EUA). Os pacientes com anemia falciforme foram recrutados no ambulatório de hemoglobinopatias do NHLBI, NIH (Ver Tabela 2 para dados clínicos e demográficos para estes pacientes).

#### **Aspectos comuns:**

- Todos os pacientes foram diagnosticados com anemia falciforme através da técnica de eletroforese de hemoglobinas;
- Não estavam em uso de medicações anti-inflamatórias, analgésicas ou de anticoagulantes;
- Compreenderam as idades de 18 a 71 anos;
- Estavam sem crises de dor ou transfusões sanguíneas por pelo menos 3 meses antes da data de coleta das amostras.
- Os indivíduos do grupo de pacientes com anemia falciforme em terapia com HU (15-30 mg/Kg/dia) estavam em uso desse medicamento por pelo menos 3 meses antes da data de coleta das amostras.

#### 4.2 Aspectos éticos da pesquisa

Este estudo foi aprovado em 26/10/2010 pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, Parecer n° 1005/2010, conforme previsto na resolução n°. 196/96 do Conselho Nacional de Saúde (CNS). Os experimentos realizados no National Institutes of Health também passaram por avaliação e foram aprovados pelo respectivo Comitê de Ética em Pesquisa ([clinicalstudies.info.nih.gov](http://clinicalstudies.info.nih.gov) identifier 03-H-0015). Todos os participantes assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido, previamente aprovados pelo CEP.

## *5. METODOLOGIA*



## 5. METODOLOGIA

### 5.1 Uso da plataforma microfluídica VenaFlux<sup>®</sup> para ensaios de adesão em fluxo e avaliação de interações heterocelulares *in vitro*

O sistema microfluídico VenaFlux (Cellix Ltd.) consiste de uma bomba de fluxo Mirus<sup>™</sup> nanopump 2.0 Evo que promove forças de cisalhamento ou *shear stress* (força exercida pelo fluxo sanguíneo em cada unidade de área de superfície endotelial - Toetsch *et al.*, 2009) controladas por um computador que se utiliza de um software específico para esta plataforma. Esta bomba promove um fluxo constante que desloca suspensões celulares aos microcanais de biochips desenvolvidos para uso neste sistema. O biochip é acoplado a uma plataforma conectada a um microscópio óptico invertido (Carl Zeiss Axiovert CFL, German) e este microscópio, por sua vez, possui uma câmera digital (DeltaPix Camera, Denmark) que adquire e transmite as imagens simultaneamente ao computador.

Os biochips utilizados na plataforma são feitos de plástico de alta qualidade e contém 8 microcanais paralelos com 20 mm de comprimento e 400 ou 800  $\mu\text{m}$  de largura, que podem ser revestidos com moléculas de adesão recombinantes (ex. ICAM-1), proteínas da matriz extracelular - MEC (ex. fibronectina) ou monocamadas de células endoteliais (ex. HUVECs). Suspensões de diferentes tipos celulares, ou até sangue total, podem ser aplicadas a cada canal sob uma força de cisalhamento determinada e a adesão destas células ao canal pode ser observada ao microscópio invertido e quantificada pelas imagens adquiridas pela câmera acoplada.

Portanto, a plataforma oferece um meio de avaliar a adesão celular sob condições mais relevantes fisiologicamente e permite uma reprodução mais fidedigna dos mecanismos *in vivo*.

#### 5.1.1 Separação de neutrófilos

O sangue periférico, coletado em tubos contendo citrato de sódio (3,2%), foi submetido ao gradiente de sedimentação pelo método de Ficoll-paque®, colocado sobre 2 camadas com densidades iguais a 1.119g/L e 1.077g/L, respectivamente, e posteriormente

centrifugado a 700xg por 30 minutos à temperatura ambiente. Após a centrifugação, a camada de células granulocíticas foi separada, transferida e lavada com PBS (*phosphate buffer saline*) 1X (pH=7,4) e, em seguida, foi realizada uma lise hipotônica (solução de amônia - 155mM NH<sub>4</sub>Cl, 10mM KHCO<sub>3</sub>) a fim de romper hemácias contaminantes.

Estas células foram novamente lavadas com PBS 1X, ressuspensas neste tampão na concentração estabelecida de 5X10<sup>6</sup> células/mL e foram imediatamente utilizadas no ensaio.

### 5.1.2 Separação de plaquetas

Aproximadamente 6 mL de sangue periférico foram coletados em tubos com ACD (Ácido Citrato Dextrose) de indivíduos controles e pacientes com anemia falciforme. Após centrifugação (20 min, 200xg, 21°C), o plasma rico em plaquetas (PRP) foi transferido para outro tubo (cerca de 3 mL) com tampão de lavagem (aproximadamente de 5 mL, 140 mM NaCl / 0.5 mM KCl / 12 mM citrato de sódio / 10 mM glicose / 12.5 mM sacarose, pH= 6), e centrifugado por 12 minutos a 800xg, 21°C. O sobrenadante foi descartado e o pellet de plaquetas ressuspensado cuidadosamente com 500 µL de solução de Krebs (118 mM NaCl / 25 mM NaHCO<sub>3</sub> / 1.2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> / 1.7 mM MgSO<sub>4</sub> / 5.6 mM glicose, pH=7,4). A contagem de plaquetas foi realizada no contador automático AcT Diff™ (Beckman & Coulter) e a concentração final foi ajustada na concentração de 2X10<sup>8</sup> plaquetas/mL para utilização nos ensaios.

### 5.1.3 Separação de células vermelhas

Amostras de sangue periférico coletadas em tubo com citrato de sódio foram centrifugadas por 10 minutos a 500xg para remoção do plasma e *buffy coat*. O pellet de eritrócitos contendo reticulócitos foi contado no contador automático AcT Diff™ (Beckman & Coulter, USA) e a concentração foi ajustada, adicionando-se PBS, para 1X10<sup>7</sup> células/mL e realizados os ensaios de adesão e interação em fluxo *in vitro*.

#### 5.1.4 Cultivo de células endoteliais HUVECs

A linhagem de células endoteliais obtidas do cordão umbilical humano foi adquirida do banco da American Type Culture Collection – ATCC, Manassas, VA, USA (ATCC – HUVECs CRL-1730<sup>TM</sup>) e cultivada, com o intuito de padronizar o uso de células endoteliais nos microchips mimetizando o ambiente vascular encontrado *in vivo*. Experimentos de adesão e interações celulares foram realizados. Estas células foram ressuspensas em meio próprio para o seu crescimento (F12K suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino e fator de crescimento endotelial indicado pelo fabricante). As células foram mantidas em incubadora a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>, de acordo com instruções do fornecedor. A contagem das células foi feita por hematócrito e avaliada a viabilidade pelo corante de azul de Trypan (concentração 1:4 de volume total e 5% de células), para a realização de subcultivos. As células foram usadas entre as 19<sup>o</sup>- 26<sup>o</sup> passagens e mantidas em estufa a 37°C com 5% CO<sub>2</sub>.

#### 5.1.5 Preparo dos biochips Vena8Fluoro+ e Vena8Endothelial+

O biochip Vena8Fluoro+ contém 8 microcapilares com 400µm de diâmetro cada, dispostos de forma paralela para ensaios baseados na adesão celular em fluxo. Cada microcapilar pode ser revestido com diferentes tipos de moléculas de adesão, como por exemplo: proteínas da MEC, ICAM-1 recombinante, fibronectina (Fn), colágeno, etc., permitindo a realização de ensaios em que há o intuito de verificar a função adesiva de determinado ligante.

Para o preparo do chip, foi adicionado 10µL do ligante (ICAM-1 10µg/mL, E-selectina 2µg/mL, fibronectina 20µg/mL, ou laminina 8µg/mL) em cada canal, de forma a preenchê-lo completamente e, em seguida, este chip foi incubado em câmara úmida à temperatura ambiente por duas horas. Após este período de incubação, os canais do biochip foram bloqueados com BSA (*Bovine Serum Albumin*) 1% por meia hora, a fim de evitar as ligações inespecíficas e, então, estes canais foram lavados duas vezes com PBS, tornando-se prontos para a passagem das suspensões celulares e avaliação da adesão.

O chip Vena8Endothelial+ contém 8 canais paralelos com 800µm de diâmetro em cada canal. Estes canais são previamente incubados “overnight” com fibronectina (100µg/mL) para no dia seguinte serem cultivadas as células endoteliais. Aproximadamente  $1 \times 10^6$  células/100µL são dispensadas no interior de cada canal, até o seu preenchimento (aproximadamente 8µL), avaliando-se a confluência ao microscópio invertido. O chip é incubado em estufa a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub> por aproximadamente 2 horas, para permitir a adesão e espalhamento das células endoteliais formando a monocamada necessária para a realização dos ensaios.

#### 5.1.6 Reagentes e proteínas recombinantes utilizados na plataforma microfluídica

*Fibronectina* (obtida de plasma humano solução a 0,1% testado em cultura celular, Sigma – F0895 – 2mg), utilizada na concentração de 20µg/mL para adesão em fluxo de neutrófilos e 100µg/mL para revestimento e cultivo de células endoteliais nos microcanais do biochip;

*Fibrinogênio* (fraction I, from human plasma), Sigma – F – 4883, 500mg – utilizado na concentração de 50µg/mL para promover a adesão em fluxo de plaquetas;

*TNF-α/TNFSF1A* recombinante humano, Cat N. 210-TA, R&D systems, Minneapolis, MN, USA - concentração de 10ng/mL, para indução do estímulo inflamatório em células endoteliais;

*ICAM-1/CD54* recombinante humano, Cat N. ADP4, R&D systems, Minneapolis, MN, USA – concentração de 10µg/mL utilizada para promoção da adesão em fluxo de neutrófilos;

*E-selectina* recombinante humano, Cat N. ADP1, R&D systems, Minneapolis, MN, USA – concentração de 2µg/mL utilizada para promoção da adesão em fluxo de neutrófilos;

*Laminina* obtida de placenta humana, Sigma – L6274 – 5mg, utilizada na concentração de 2µg/cm<sup>2</sup> para adesão em fluxo de hemácias.

### 5.1.7 Avaliação das interações heterocelulares de neutrófilos na plataforma microfluídica

Nos experimentos de interação de neutrófilos-plaquetas, neutrófilos foram dispensados em fluxo por 3 minutos com um shear stress de  $0,5\text{d}/\text{cm}^2$  para que pudessem aderir aos microcanais. A quantificação da adesão foi feita através da contagem de células estáticas nas imagens adquiridas nos primeiros 10 segundos e após 2 minutos e 40 segundos de fluxo das células. Em seguida, plaquetas foram dispensadas nos microcanais por mais 3 minutos a  $0,5\text{d}/\text{cm}^2$  para interagir aos neutrófilos aderidos; iniciou-se a tiragem sequencial de fotos a cada segundo pela câmera digital acoplada ao microscópio. A análise e quantificação das interações foram feitas, posteriormente, através da visualização das 180 imagens adquiridas por canal. O mesmo foi feito quando foram primeiramente dispensadas as plaquetas em fluxo (neutrófilos interagindo a plaquetas aderidas).

Para os experimentos de interação de células vermelhas a neutrófilos previamente aderidos, estes foram dispensados nos microcanais por 2 minutos a  $0,7\text{d}/\text{cm}^2$ . A quantificação da adesão de neutrófilos foi feita através da visualização de imagens adquiridas nos primeiros 10 segundos e após 1 minuto e 40 segundos. Em seguida, as células vermelhas foram adicionadas em fluxo de  $0,3\text{d}/\text{cm}^2$  por 2 minutos e uma foto a cada segundo foi tirada pela câmera para posterior análise das imagens e quantificação destas interações.

O número de células aderidas foi avaliado visualmente em 3 diferentes posições do canal em um campo de  $250\ \mu\text{m} \times 330\ \mu\text{m}$  e as imagens adquiridas pela câmera utilizando objetiva com magnificação de 40X para os experimentos de adesão e interação celular. Um neutrófilo aderido foi considerado como aquele que permaneceu nas imagens por 30s ou mais, enquanto uma interação neutrófilo-hemácia foi definida como a visualização desta interação (captura da imagem) de forma nítida por, no mínimo, 1 aquisição de imagem, o que corresponde a um segundo. Este intervalo de tempo foi considerado baseado em prévias publicações (Kaul *et al.*, 2000; Kaul *et al.*, 2004; Kalambur *et al.*, 2004; Turham, 2004; Finnegan *et al.*, 2007), por se tratar do tempo mínimo necessário para poder considerar como interação celular e não como evento resultante das condições de fluxo *in vitro*. Interações mais breves não representam uma captura celular real e dificilmente

contribuirão significativamente para uma oclusão vascular *in vivo*. As hemácias, neutrófilos e plaquetas foram identificadas através da sua morfologia e tamanho.

#### 5.1.8 Desenvolvimento de um novo biochip para estudo dos processos vaso-oclusivos

Um novo biochip foi desenvolvido para uso na plataforma microfluídica (Cellix VenaFlux, Ltd.), com o intuito de avaliar a adesão e obstrução de diferentes tipos celulares circulantes sanguíneos em canais que mimetizam e simulam a anastomose encontrada nos microcapilares. Através da inserção e disposição de postes nos canais com 400µm de diâmetro, reduziu-se o diâmetro do caminho percorrido pelas células nestes microcanais de 40 a 10 µm, reproduzindo a geometria encontrada nos capilares *in vivo*. A obstrução provocada pelas células, após fluxo por 3 minutos a uma força de cisalhamento de 0,2 dynes/cm<sup>2</sup>, quando dispensadas as hemácias ou neutrófilos separadamente, ou 0,5 dynes/cm<sup>2</sup> quando as hemácias foram dispensadas com os neutrófilos, foi quantificada utilizando um software fornecido pela empresa Zeiss (AxioVision Le64 – Carl Zeiss MicroImaging, GmbH, German). O software fornece os valores de obstrução em histograma, baseado no escurecimento da imagem provocada pela adesão de células nos microcanais, assim, é feita uma comparação com a foto 0 (tirada no momento 0 segundo do fluxo de células), em que não há células aderidas, com o escurecimento da imagem promovido pela adesão de células na foto 180 (tirada no momento 180 segundos do fluxo das células). O delta, isto é, a subtração das medidas obtidas no momento 0 e 180 segundos, foram representados nas análises como unidades arbitrárias (U.A.). As imagens foram adquiridas pela câmera com objetiva de magnificação de 20X.

#### 5.2 ImageStreamX MKII - Citometria de fluxo com imagem para identificação de agregados heterocelulares de neutrófilos *in vitro*

Nós verificamos, através da tecnologia da citometria de fluxo com imagem, Amnis® ImageStream<sup>X</sup> MKII imaging flow cytometer (Amnis Corporation, Seattle, WA, USA), a presença de agregados neutrófilo-hemácia e neutrófilo-plaqueta no sangue

periférico coletado em tubo de heparina, obtido de pacientes AF e de indivíduos saudáveis.

Para identificação de agregados neutrófilo-plaqueta, o sangue periférico foi submetido à lise das hemácias, utilizando o tampão de lise (Pharm Lyse Buffer – BD) e, em seguida, lavadas com DPBS Calcium, Magnesium (Dulbecco's *phosphate buffer saline* - 1X - pH=7,4). O sedimento celular foi distribuído na concentração de aproximadamente  $1 \times 10^7$  células/mL em tubos de citometria. Para observação dos agregados neutrófilo-hemácia, a amostra de sangue dos indivíduos foi submetida ao gradiente de sedimentação por ficoll. Após a centrifugação, a camada de células granulocíticas foi separada, transferida para tubos de citometria, realizada a marcação de células com anticorpos fluorescentes e, em seguida, lidas ao citômetro.

#### 5.2.1 Preparo da citometria de fluxo e marcação com anticorpos fluorescentes

Para a identificação dos agregados heterocelulares de neutrófilos, os seguintes anticorpos monoclonais foram utilizados: mouse anti-human CD11a-APC (550852), mouse anti-human CD11b-APC-Cy7 (560914), mouse anti-human CD66b-V450 (561649), mouse anti-human CD16-PECy5 (555408) para a marcação das proteínas e identificação dos neutrófilos; mouse anti-human CD41a-FITC (557296), mouse anti-human CD62P-PE (561921) para a marcação de plaquetas, e seus respectivos controles isotípicos - todos provenientes da BD biosciences; mouse anti-human CD71-FITC (MHCD71014) e mouse anti-human CD235a-PE (MHGLA044) para a marcação das células vermelhas, foram adquiridos da Caltag Invitrogen; e seus respectivos controles isotípicos. A incubação foi feita por 25 minutos à temperatura ambiente e protegido da luz. Em seguida, as células foram lavadas com PBS e a leitura feita no citômetro de fluxo convencional ou com imagem.

#### 5.2.2 Uso de anticorpos bloqueadores de função para identificação das moléculas envolvidas nos agregados heterocelulares

Anticorpos bloqueadores de função anti-CD11a (MCA1848XZ), e anti-CD11b (MCA551XZ) foram adquiridos da AbD Serotec; Anticorpos bloqueadores de CD62P

(BBA30), CD49d (BBA37), e BCAM (AF148) foram adquiridos da R&D biosystems; o peptídeo inibidor de ICAM-4 foi adquirido da empresa Santa Cruz Biotech (SC-27685). Os respectivos controles isotópicos foram adquiridos de cada empresa correspondente.

### 5.2.3 Análise e interpretação dos resultados

Para identificação dos agregados de neutrófilo a células vermelhas ou plaquetas no citômetro de fluxo convencional (FACSCalibur, BD Pharmingen, San Diego, USA), os neutrófilos foram identificados com anticorpos anti-CD16 e através do gate SSC/FSC. Neste gate identificamos a porcentagem de células duplo positivas para CD16 (neutrófilos) e CD235a (células vermelhas), delimitando a população de agregados heterocelulares. A análise foi feita através do software FACSDiva, do mesmo fabricante.

A combinação do citômetro de fluxo com imagem ImageStreamX e o software IDEAS permite a determinação da média de intensidade de fluorescência da população celular com imagem simultânea de cada célula no campo claro e em todos os canais relevantes de fluorescência. Este equipamento fornece a oportunidade de conectar dados de fluorescência com a morfologia da célula, tornando os dados mais consistentes e confiáveis. Para identificação dos agregados de neutrófilo-hemácia e neutrófilo-plaqueta, células positivas para a proteína CD66b (marcador para granulócitos) foram adquiridas (~6000 eventos), as imagens foram adquiridas pela câmera utilizando a objetiva de 40X e os dados foram analisados pelo software IDEAS 6.0. Células em foco CD66b+ foram separadas e, em seguida, discriminadas em “single” ou “mais de uma célula”. Uma imagem em dot-plot foi feita para identificar células duplo positivas para CD66b e CD235a nos experimentos de identificação de agregados neutrófilo-eritrócitos e CD66b e CD41a nos experimentos de agregados neutrófilo-plaquetas. Através da função *delta-centroid* foi possível eliminar células duplo positivas em um mesmo frame que não estavam agregadas.

### 5.3 Análise estatística

Os dados foram plotados em planilhas do Excel ou no software GraphPad Prism version 5. Para as análises estatísticas, inicialmente foram realizados testes para verificação da distribuição normal dos valores: Kolmogorov-Smirnov e Shapiro-Wilk. Após verificação da distribuição dos valores, foram feitos testes paramétricos quando a distribuição foi normal (teste t para dois grupos ou ANOVA seguido pelo pós-teste de Bonferroni, para mais de dois grupos) ou quando a distribuição não seguiu os padrões de normalidade, foram realizados testes não-paramétricos (Mann Whitney para dois grupos ou Kruskal-Wallis seguido pelo pós-teste de Dunn, para comparações de 3 grupos ou mais). Teste t pareado foi feito nas comparações entre diferentes anticorpos bloqueadores de função utilizados em células de mesmo indivíduo em um mesmo ensaio. O teste de Spearman (não-paramétrico) foi utilizado para as análises de correlação. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  erro da média. Valores de  $P < 0,05$  foram considerados como estatisticamente significantes.



## *6.RESULTADOS*



## 6. RESULTADOS

### 6.1 Subprojeto 1: Avaliação das interações heterotípicas de neutrófilos previamente aderidos, pelo uso da plataforma microfluídica

Verificamos as interações de plaquetas ou células vermelhas com neutrófilos previamente aderidos a células ou a ligantes endoteliais, através do uso da plataforma microfluídica de adesão em fluxo *in vitro* (Cellix VenaFlux Ltd). Para estes experimentos, o sangue periférico de controles (indivíduos saudáveis) e pacientes com AF em terapia ou não da HU, recrutados no ambulatório de hematologia do hemocentro da UNICAMP, foi coletado e isoladas as células de interesse para realização do ensaio. Segue abaixo, os dados clínicos dos pacientes AF utilizados neste estudo (Tabela 1). Os controles foram pareados aos pacientes em sexo ou idade quando possível.

**Tabela 1. Detalhes clínicos dos pacientes participantes deste estudo (população brasileira – Hemocentro, UNICAMP, Campinas, Brasil)**

	AF	AFHU
<b>Homem/Mulher</b>	12/21	16/14
<b>Idade (anos)</b>	35,3 (35; 18; 53)	41,7 (41; 24; 71)
<b>Células vermelhas (<math>10^{12}/L</math>)</b>	2,66 (2,6; 1,7; 3,8)	2,23 (2,2; 1,1; 3,6)
<b>Hematócrito (%)</b>	24,5 (23,9; 18,4; 33,9)	25,6 (25,5; 14; 35,2)
<b>Hemoglobina (g/L)</b>	8,1 (7,8; 6,4; 11)	8,4 (8,3; 4,6; 11,2)
<b>Vol. Corpuscular médio (fl)</b>	92,7 (90,1; 76,8; 118,5)	118 (118,6; 90,9; 150,4)
<b>Reticulócitos (%)</b>	16,4 (15,4; 5,6; 37,3)	9,6 (8,9; 2,3; 28,3)
<b>Contagem leucócitos (<math>10^9/L</math>)</b>	10,4 (10,4; 5,3; 14,8)	6 (5,6; 2,7; 11)
<b>Contagem plaquetas (<math>10^9/L</math>)</b>	453 (462; 267; 729)	409,1 (358; 153; 1370)
<b>HbF (%)</b>	7,8 (7,3; 1,2; 18,4)	14,5 (14,5; 1,5; 28,3)

Com exceção do sexo, todos os dados estão representados como média (mediana; mínimo; máximo) valores para pacientes com AF em estado estável (AF), pacientes AF em terapia com HU (AFHU; 15–30 mg/kg/d). HbF, hemoglobina fetal.

### 6.1.1 Padronização do uso da plataforma microfluídica para avaliação da adesão e interações celulares

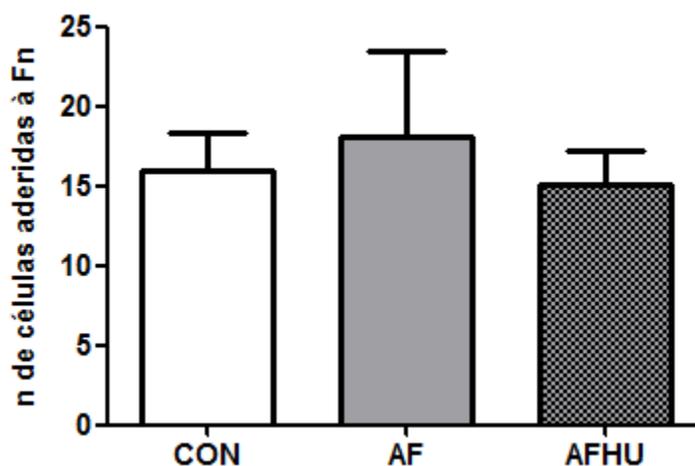
A plataforma microfluídica Cellix VenaFlux foi adquirida em 2010 pelo nosso laboratório e foram necessárias algumas padronizações, já que naquele momento era um sistema recente e não havia tecnologia semelhante no Brasil.

Primeiramente estabelecemos a força de cisalhamento (*shear stress*) que seria utilizada em nossos experimentos, de forma a corresponder à velocidade do fluxo sanguíneo encontrada em vasos de mesmo calibre *in vivo*, e definimos como  $0,5\text{d}/\text{cm}^2$  o *shear stress* utilizado para os chips com  $400\mu\text{m}$  de diâmetro. Em seguida, estabelecemos a concentração da proteína ligante fibronectina (ligante para neutrófilos) para revestimento no biochip,  $20\mu\text{g}/\text{mL}$ , e a de fibrinogênio (como ligante para plaquetas),  $50\mu\text{g}/\text{mL}$ , para os ensaios de adesão e, posteriormente de interação entre neutrófilo-plaqueta.

A concentração de células foi estabelecida de forma que não houvesse prejuízo quanto a visualização das células aderidas pelas imagens adquiridas. A concentração da suspensão de neutrófilos foi definida para  $5 \times 10^6$  células/mL, células vermelhas para  $1 \times 10^7$  células/mL, enquanto as plaquetas em PRP ou lavadas na concentração de  $2 \times 10^8$  plaquetas/mL, e o tempo de fluxo em cada canal foi ajustado para 2 a 3 minutos em cada processo.

### 6.1.2 Adesão em fluxo *in vitro* de neutrófilos de indivíduos saudáveis e pacientes com anemia falciforme

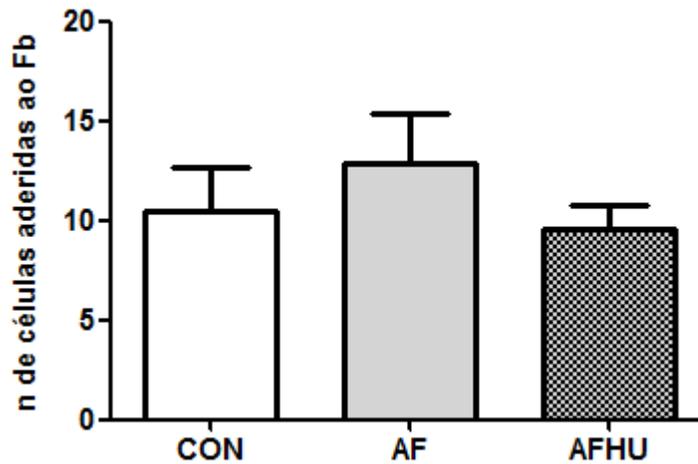
Avaliamos a adesão em fluxo de neutrófilos à fibronectina (Fn;  $20\mu\text{g}/\text{mL}$ ) por 3 minutos, sob fluxo de  $0,5\text{d}/\text{cm}^2$ , de células isoladas de controles saudáveis (CON) e pacientes com anemia falciforme (AF) sem ou com o uso da terapia com hidroxiureia (AFHU) (Figura 3). Apesar de observada uma tendência a um aumento na adesão de neutrófilos de pacientes AF (como visto anteriormente com ensaios de adesão estática *in vitro*), este aumento não foi estaticamente significativo.



**Figura 3.** Adesão em fluxo de neutrófilos ( $5 \times 10^6$  /mL) à fibronectina (Fn;  $20 \mu\text{g/mL}$ ) por 3 minutos, sob força de cisalhamento de  $0,5 \text{ d/cm}^2$  e  $37^\circ\text{C}$ . Células de indivíduos controles (CON,  $n=23$ ), pacientes AF (AF,  $n=08$ ), pacientes AF em terapia com HU (AFHU,  $n=09$ ).  $P > 0.05$ . Foi determinado o número de células aderidas num campo de visão de  $0.08 \text{ mm}^2$ .

### 6.1.3 Adesão em fluxo *in vitro* de plaquetas de indivíduos saudáveis e pacientes com anemia falciforme

A adesão em fluxo ( $0,5 \text{ d/cm}^2$ ) de plaquetas ao fibrinogênio (Fb -  $50 \mu\text{g/mL}$ ) foi avaliada em células provenientes de indivíduos saudáveis (CON) e pacientes com anemia falciforme (AF) sem ou com o uso da terapia com hidroxureia (HU) (Figura 4). Entretanto, apesar da discreta tendência a um aumento da adesão em fluxo de plaquetas de células provenientes de pacientes AF, essa diferença não foi estatisticamente significativa.

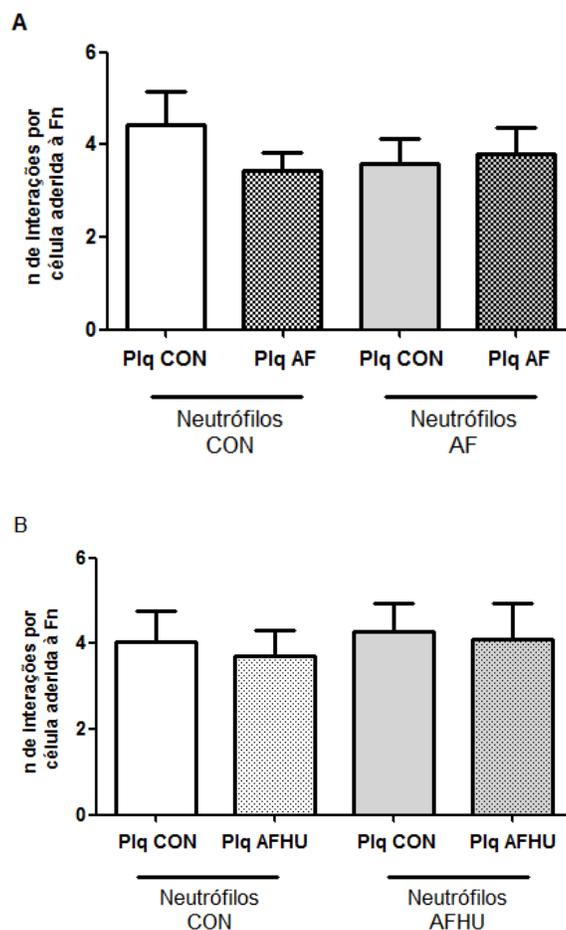


**Figura 4.** Adesão em fluxo *in vitro* de plaquetas ( $2 \times 10^8$  /mL) ao Fibrinogênio (Fb;  $50 \mu\text{g/mL}$ ) por 3 minutos, força de cisalhamento de  $0,5 \text{ d/cm}^2$  e à  $37^\circ\text{C}$ . Células de controle (CON,  $n=09$ ), pacientes AF (AF,  $n=04$ ), pacientes AF em terapia com hidroxíureia (AFHU,  $n=06$ ).  $P>0.05$ . Foi determinado o número de células aderidas num campo de visão de  $0.08 \text{ mm}^2$ .

#### 6.1.4 Avaliação das interações heterotípicas de neutrófilos e plaquetas de indivíduos saudáveis e pacientes com anemia falciforme

Analisamos a formação sob fluxo de  $0,5 \text{ d/cm}^2$ , das interações heterocelulares de neutrófilos e plaquetas de indivíduos controles e pacientes AF. Para avaliação das interações de plaquetas com neutrófilos aderidos, primeiramente foi dispensada a suspensão de neutrófilos por 3 minutos (os quais aderiram a fibronectina durante este tempo) e, em seguida, dispensamos o plasma rico em plaquetas (PRP). Uma imagem a cada segundo foi adquirida por 3 minutos pela câmera do microscópio, para a avaliação das interações destas células com os neutrófilos aderidos (Figura 5). Foi considerado como um evento de interação o contato entre as células por 1 frame de imagem ou mais (Figura 6).

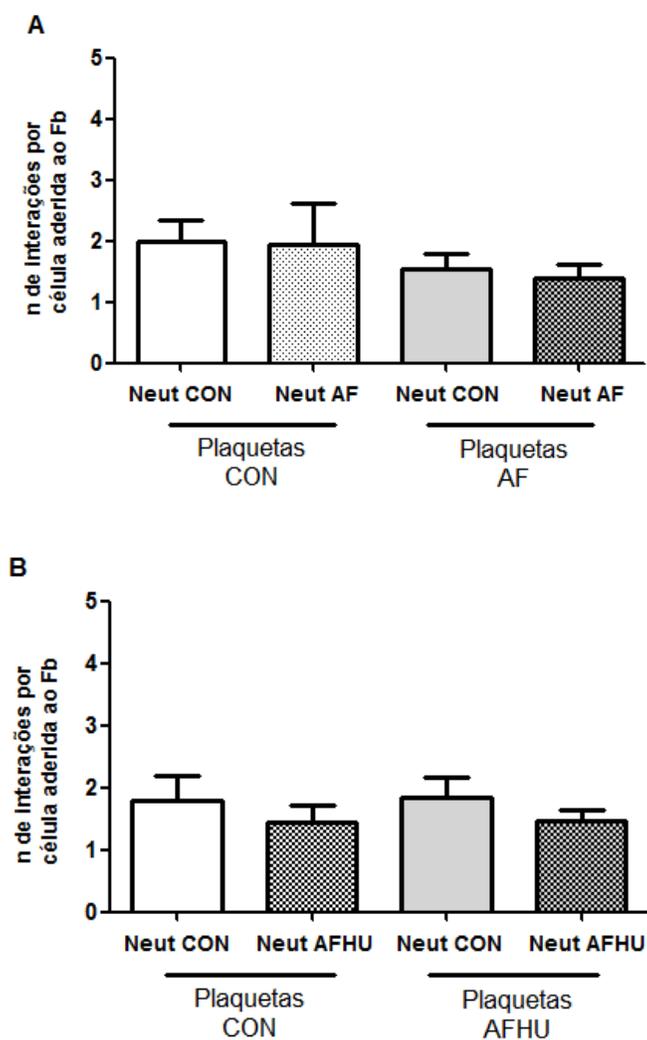
Não observamos diferenças significativas quanto ao número de interações das plaquetas de controles ou de pacientes AF/AFHU com os neutrófilos previamente aderidos destes indivíduos (Figura 5).



**Figura 5.** Interações de plaquetas (Plq) com neutrófilos previamente aderidos; Neutrófilos ( $5 \times 10^6$  /mL) de indivíduos controle (CON), (A) pacientes com anemia falciforme (AF) e (B) pacientes com anemia falciforme em terapia com HU (AFHU) estavam aderidos à Fb ( $20 \mu\text{g/mL}$ ) através do ensaio de adesão em fluxo de  $0,5 \text{ d/cm}^2$  e  $37^\circ\text{C}$  e, em seguida, o PRP ( $2 \times 10^8$  células/mL) de CON e pacientes AF (A) ou AFHU (B) foi dispensado por 3 minutos a  $0,5 \text{ d/cm}^2$ , e avaliadas as interações heterotípicas das células.  $P > 0,05$ .  $N = 08$  para todos os grupos.

Avaliando as interações de neutrófilos com plaquetas aderidas, foi feito o inverso, começando inicialmente o fluxo com o plasma rico em plaquetas, as quais aderiram ao fibrinogênio e depois avaliamos a interação dos neutrófilos que foram dispensados subsequentemente às plaquetas previamente aderidas. Ao se avaliar as interações de neutrófilos de indivíduos controle e pacientes AF com ou sem uso da terapia com HU, às plaquetas destes indivíduos que estavam aderidas ao fibrinogênio (Fb –  $50 \mu\text{g/mL}$ ), não

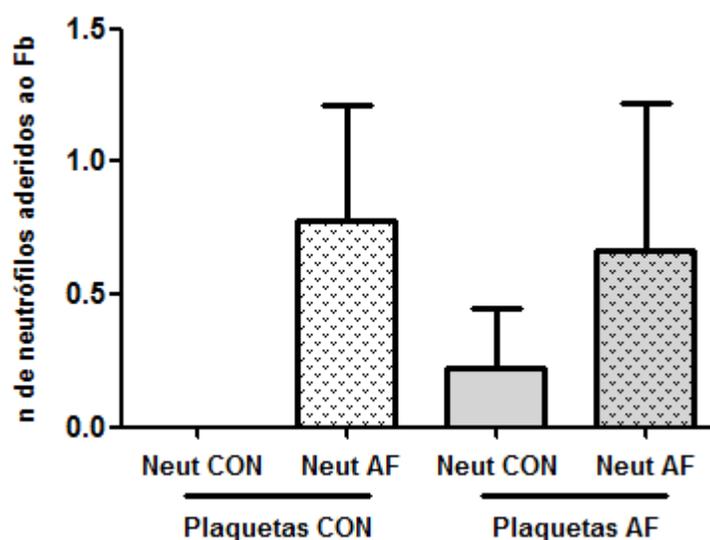
observamos diferenças significativas quanto ao número de interações de neutrófilos com plaquetas aderidas nos grupos avaliados (Figuras 6 A e B).



**Figura 6.** Interações de neutrófilos (Neut) com plaquetas previamente aderidas ao Fb; Plaquetas ( $2 \times 10^8$  /mL) de indivíduos controle (CON), (A) pacientes com anemia falciforme (AF) e (B) pacientes com anemia falciforme em terapia com HU (AFHU) estavam aderidas ao Fb ( $50 \mu\text{g/mL}$ ) através do ensaio de adesão em fluxo de  $0,5 \text{ d/cm}^2$  e  $37^\circ\text{C}$  e, em seguida, neutrófilos ( $5 \times 10^6$  /mL) de CON e pacientes AF (A) ou AFHU (B) foram dispensados por 3 minutos a  $0,5 \text{ d/cm}^2$ , e avaliadas as interações heterotípicas das células.  $P > 0,05$ .  $N = 08$  para todos os grupos.

### 6.1.5 A influência da presença de plaquetas aderidas nos microcanais na adesão de neutrófilos ao fibrinogênio

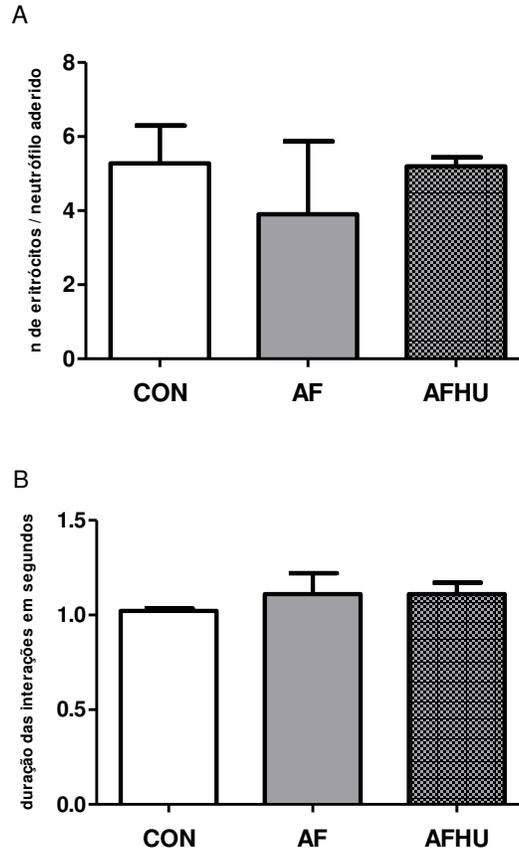
Potencialmente, as plaquetas liberam várias quimiocinas e moléculas inflamatórias que, quando ativadas, podem influenciar na adesão do neutrófilo a um ligante, sem a necessidade de haver alguma interação entre os dois tipos celulares. Então, avaliamos o número de neutrófilos que aderiram ao fibrinogênio quando já haviam plaquetas aderidas no canal do chip. Observamos uma tendência a um aumento do número de neutrófilos de pacientes AF comparado aos neutrófilos de CON, que aderem durante o fluxo de 3 minutos (Figura 7). Em adição, a presença de plaquetas de pacientes AF aparentemente aumenta a habilidade dos neutrófilos de controles e de pacientes AF a aderir ao fibrinogênio.



**Figura 7.** Adesão em fluxo *in vitro* de neutrófilos (Neut) de indivíduos controles (CON) e pacientes AF em terapia ou não com a HU, na presença de plaquetas (CON e pacientes AF) previamente aderidas aos microcanais revestidos com Fb (50 $\mu$ g/mL). Fluxo de 3 min., força de cisalhamento de 0,5 d/cm<sup>2</sup> e à 37<sup>o</sup>C. P>0.05. N=7 para todos os grupos. Foi determinado o número de células aderidas num campo de visão de 0.08mm<sup>2</sup>.

#### 6.1.6 Interação de células vermelhas a neutrófilos previamente aderidos a fibronectina

Realizamos alguns experimentos preliminares para observação das interações de células vermelhas com neutrófilos previamente aderidos à Fn, que foi utilizada como ligante no biochip. Entretanto, não foram encontradas diferenças significativas quanto ao número de interações de hemácias com cada neutrófilo aderido nos microcanais entre os grupos de controle e pacientes AF avaliados (Figura 8 A). Avaliando-se a duração em segundos das interações de hemácias com os neutrófilos aderidos à Fn, também não observamos diferenças entre os grupos de pacientes AF e controles (Figura 8 B).

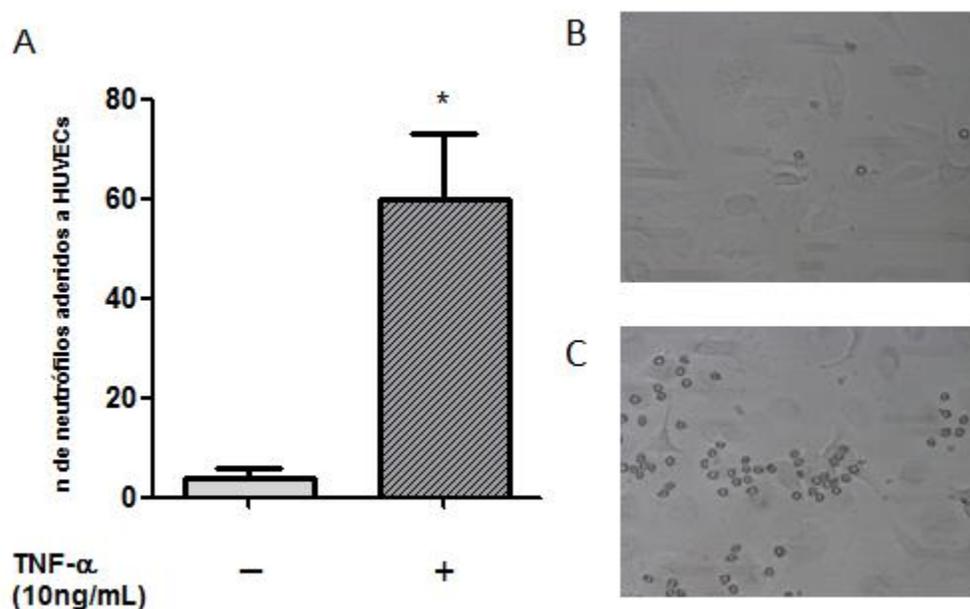


**Figura 8.** (A) Média do número de interações de hemácias ( $1 \times 10^7$  /mL) por neutrófilo autólogo ( $5 \times 10^6$  /mL) aderido à proteína recombinante fibronectina ( $20 \mu\text{g}/\text{mL}$ ) num biochip (canal  $400 \mu\text{m}$ ); (B) Duração em segundos da captura de hemácias por estes neutrófilos; Neutrófilos foram permitidos a aderir por 2 minutos ( $0,7 \text{ d}/\text{cm}^2$ ), em seguida, foram adicionadas hemácias em fluxo por 2 minutos ( $0,3 \text{ d}/\text{cm}^2$ ) e avaliada as interações das células. Células provenientes de Controle (CON,  $n=05$ ), pacientes AF (AF,  $n=02$ ) e pacientes AF em terapia com HU (AFHU,  $n=03$ );  $P > 0.05$ .

#### 6.1.7 Padronização da adesão em fluxo de neutrófilos a células endoteliais HUVECs

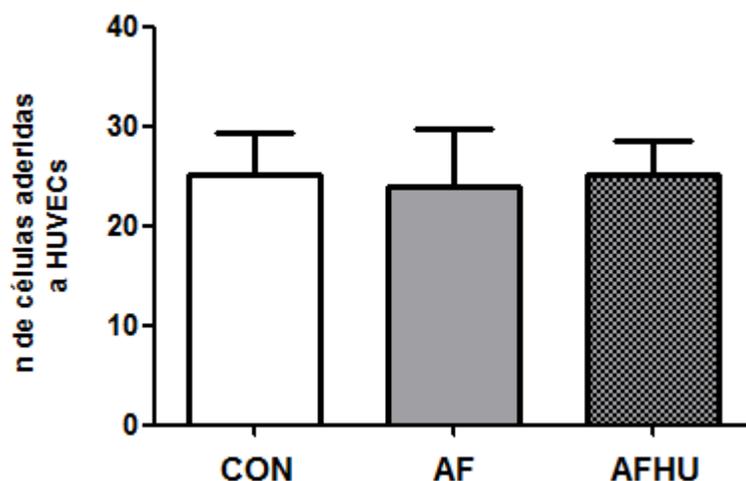
Avaliamos a adesão em fluxo *in vitro* de neutrófilos às células endoteliais HUVECs. Na ausência de estímulo inflamatório, poucos neutrófilos ou nenhum aderiram às HUVECs, o que inviabilizaria os experimentos posteriores de interação, já que haveriam poucos neutrófilos aderidos aos canais (Figura 9 A, B). Trabalhos de nosso e outros laboratórios mostraram que o estímulo de células endoteliais com  $\text{TNF-}\alpha$  resulta na sua ativação e expressão das moléculas de adesão ICAM-1 e E-selectina (Finnegan *et al.*, 2007; Makó *et*

*al.*, 2010; Canalli *et al.*, 2011). Então, observamos a adesão destas células após estímulo com TNF- $\alpha$  (10ng/mL) e mensuramos uma adesão de aproximadamente 60 neutrófilos (controles) por campo analisado (Figura 9 A, C).



**Figura 9.** (A). Adesão de neutrófilos de indivíduos controles ( $5 \times 10^6$  /mL) às HUVECs ( $1 \times 10^7$  /mL/canal) cultivadas em biochips (800 $\mu$ m), na ausência ou presença de estímulo inflamatório promovido pelo TNF- $\alpha$  (10ng/mL por 3h). Fluxo de 3 minutos, sob força de cisalhamento de 0,5 d/cm<sup>2</sup> à 37<sup>o</sup>C; n=05. \*P<0.05 de acordo com teste t pareado. Imagens representativas de neutrófilos controles aderidos a HUVECs (B) sem estímulo (basal) e (C) ativadas por TNF- $\alpha$ . Foi determinado o número de células aderidas num campo de visão de 0.08mm<sup>2</sup>, com objetiva de magnificação de 40X.

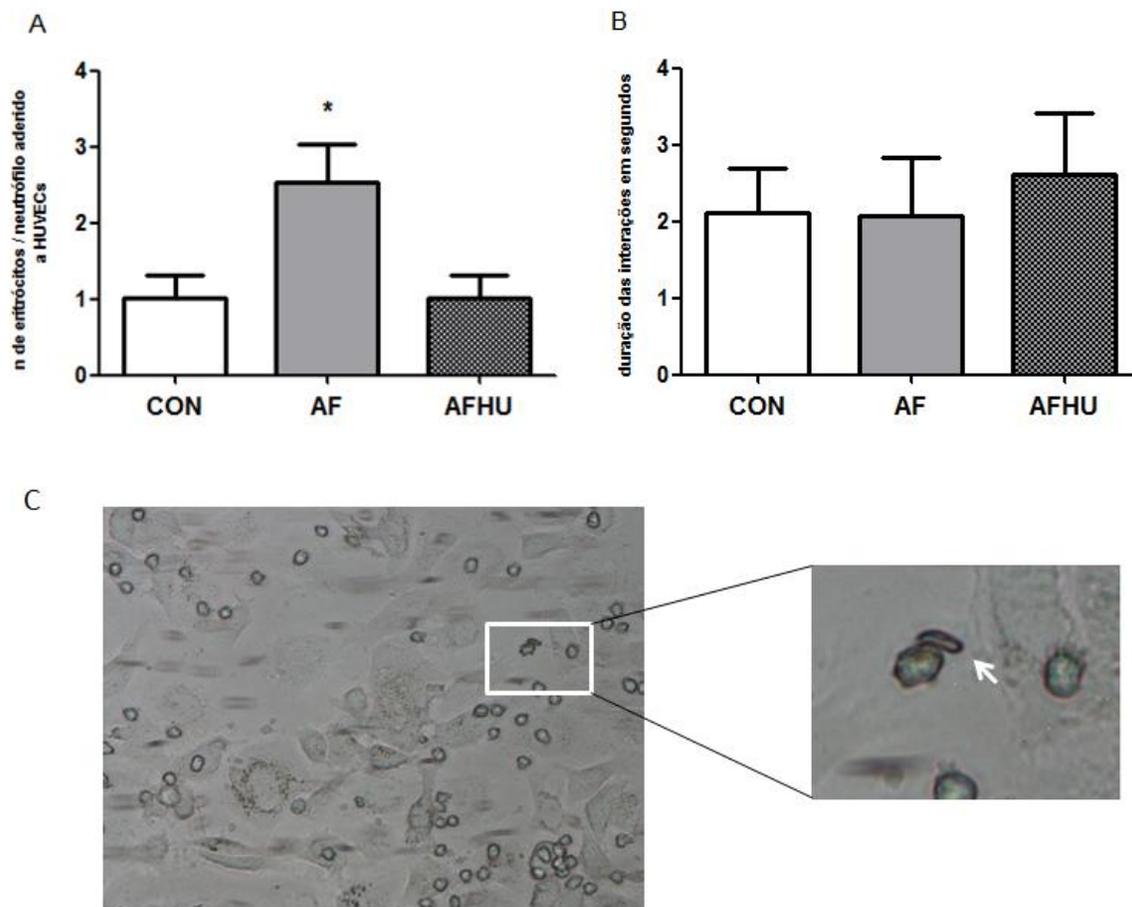
Assim, definimos a concentração e tempo de incubação do estímulo com TNF- $\alpha$  nestas HUVECs (10ng/mL; 2h), bem como a velocidade do fluxo a ser aplicada (0,7d/cm<sup>2</sup>), para serem realizados os ensaios de adesão e interações heterocelulares. Subsequentemente, realizamos ensaios de adesão de neutrófilos de controles e pacientes com AF (em uso ou não da terapia de HU) às HUVECs (Figura 10), entretanto não observamos diferenças significativas quanto aos valores de adesão dos neutrófilos às células endoteliais.



**Figura 10.** Adesão de neutrófilos ( $5 \times 10^6$  /mL) às HUVECs ( $1 \times 10^7$  /mL/canal) cultivadas em biochips ( $800 \mu\text{m}$ ), na presença de estímulo inflamatório promovido pelo  $\text{TNF-}\alpha$  ( $10 \text{ ng/mL}$ ; 2h). Fluxo de 2 minutos, sob força de cisalhamento de  $0,7 \text{ d/cm}^2$ . Células provenientes de controles (CON,  $n=10$ ), pacientes com anemia falciforme (AF,  $n=07$ ) e pacientes com anemia falciforme em uso da terapia com HU (AFHU,  $n=10$ );  $P>0.05$ . Foi determinado o número de células aderidas num campo de visão de  $0.08 \text{ mm}^2$ .

#### 6.1.8 Interação de células vermelhas a neutrófilos previamente aderidos a células endoteliais HUVECs

Avaliamos as interações de hemácias com os neutrófilos aderidos a HUVECs. Hemácias ( $1 \times 10^7$  células/mL) provenientes de indivíduos saudáveis (CON), pacientes AF (AF) e pacientes AF em terapia com HU (AFHU) foram dispensadas por 2 minutos a  $0,3 \text{ d/cm}^2$  (fluxo lento) e avaliadas as interações com os neutrófilos autólogos previamente aderidos às HUVECs (estimuladas com  $\text{TNF-}\alpha$ ). Foi quantificada a média do número de hemácias que interagiram aos neutrófilos aderidos (Figura 11 A) e a média da duração em segundos destas interações (Figura 11 B). Os resultados demonstram que eritrócitos de pacientes AF interagiram significativamente mais aos neutrófilos autólogos aderidos às células endoteliais comparados as células de controle e pacientes AF em terapia com HU. A duração em segundos destas interações não diferiu entre os grupos avaliados.

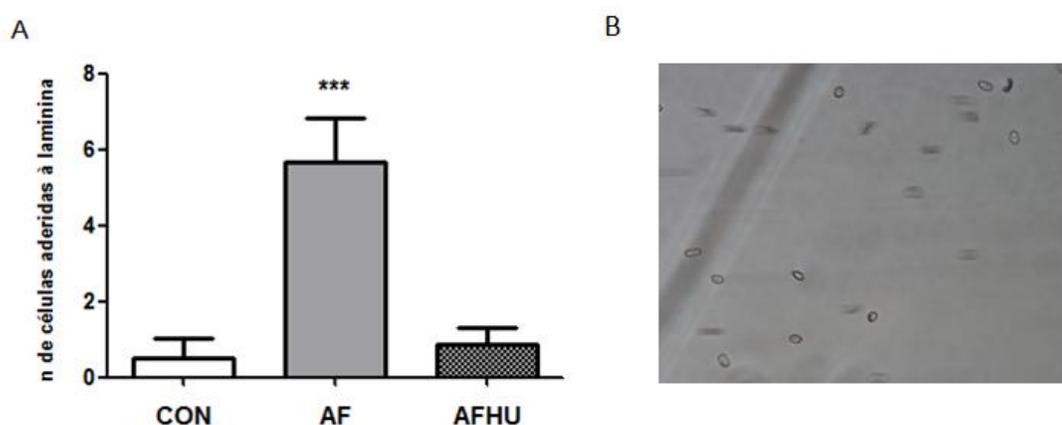


**Figura 11.** (A) Média do número de interações de hemácias ( $1 \times 10^7$  /mL) com os neutrófilos autólogos ( $5 \times 10^6$  /mL) aderidos às HUVECs ( $1 \times 10^7$ /mL/canal; TNF- $\alpha$  10ng/mL, 2h) cultivadas nos microcanais dos biochips; \* $P < 0.05$ , comparado aos grupos controle e AFHU, de acordo com ANOVA seguido pelo teste de Tukey; (B) Duração em segundos da captura de hemácias por estes neutrófilos; Neutrófilos foram permitidos a aderir por 2 minutos ( $0,7 \text{ d/cm}^2$ ) e, em seguida, foram adicionadas hemácias em fluxo por mais 2 minutos ( $0,3 \text{ d/cm}^2$ ). Células provenientes de Controle (CON, n=10), pacientes AF (AF, n=12) e pacientes AFHU (AFHU, n=09); (C) Imagem adquirida com objetiva de magnificação de 40X, de neutrófilos aderidos a HUVECs e hemácias em fluxo e representação em maior aumento (quadrante branco - imagem ampliada em 11 X) da interação neutrófilo-hemácia; seta branca apontando hemácia.

#### 6.1.9 Adesão em fluxo *in vitro* de células vermelhas à laminina

Devido a não observação de diferenças significativas quanto a adesão de neutrófilos AF comparada a de neutrófilos CON, às células endoteliais e pelo fato de termos observado

um número elevado de interações de hemácias com neutrófilos no grupo AF, nós avaliamos a adesão de células vermelhas à laminina, um ligante para a molécula de adesão BCAM/Lu expressa nas células vermelhas. Comparando-se a adesão de hemácias provenientes dos três grupos, observamos um aumento significativo da adesão de hemácias provenientes do grupo de pacientes AF comparada aos grupos CON e pacientes AFHU (Figura 12). Apesar de não ser um processo de adesão firme e prolongada como encontrado nos neutrófilos, as hemácias AF resistem mais ao *shear stress* provocado pelo fluxo comparadas as hemácias de controles.



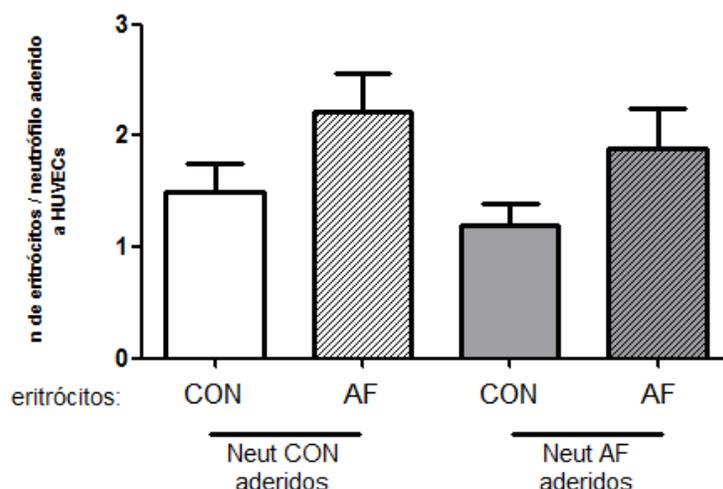
**Figura 12.** (A). Adesão de hemácias ( $5 \times 10^6$  células/mL) à laminina ( $2 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) por 3 minutos, sob força de cisalhamento de  $0,5 \text{ d}/\text{cm}^2$ . Células provenientes de Controles (CON,  $n=07$ ), pacientes AF (AF,  $n=07$ ) e pacientes AF em uso da terapia com HU (AFHU,  $n=04$ );  $***P < 0.001$ , comparado ao grupo Controle e AFHU, de acordo com ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni. (B) Imagem representativa adquirida com objetiva de magnificação de 40X, da adesão de hemácias de paciente AF em microcanal em campo de visão de  $0.08 \text{ mm}^2$ .

#### 6.1.10 Avaliação do papel das hemácias na ocorrência das interações neutrófilo-hemácia

Investigamos se as células vermelhas seriam o tipo celular responsável pela maior ocorrência de interações neutrófilo-hemácia de células provenientes de pacientes AF. Para isso, realizamos experimentos de interação de células vermelhas a neutrófilos heterólogos aderidos a HUVECs, isto é, dispensamos hemácias de controles ou de pacientes AF para

interagir a neutrófilos de controles ou pacientes AF que estavam aderidos a HUVECs estimuladas por TNF- $\alpha$ .

Apesar de os resultados não terem sido significativos, observamos que as hemácias de pacientes AF parecem interagir mais aos neutrófilos comparadas as células vermelhas de controles (Figura 13), sugerindo um papel principal das células vermelhas nestas interações.



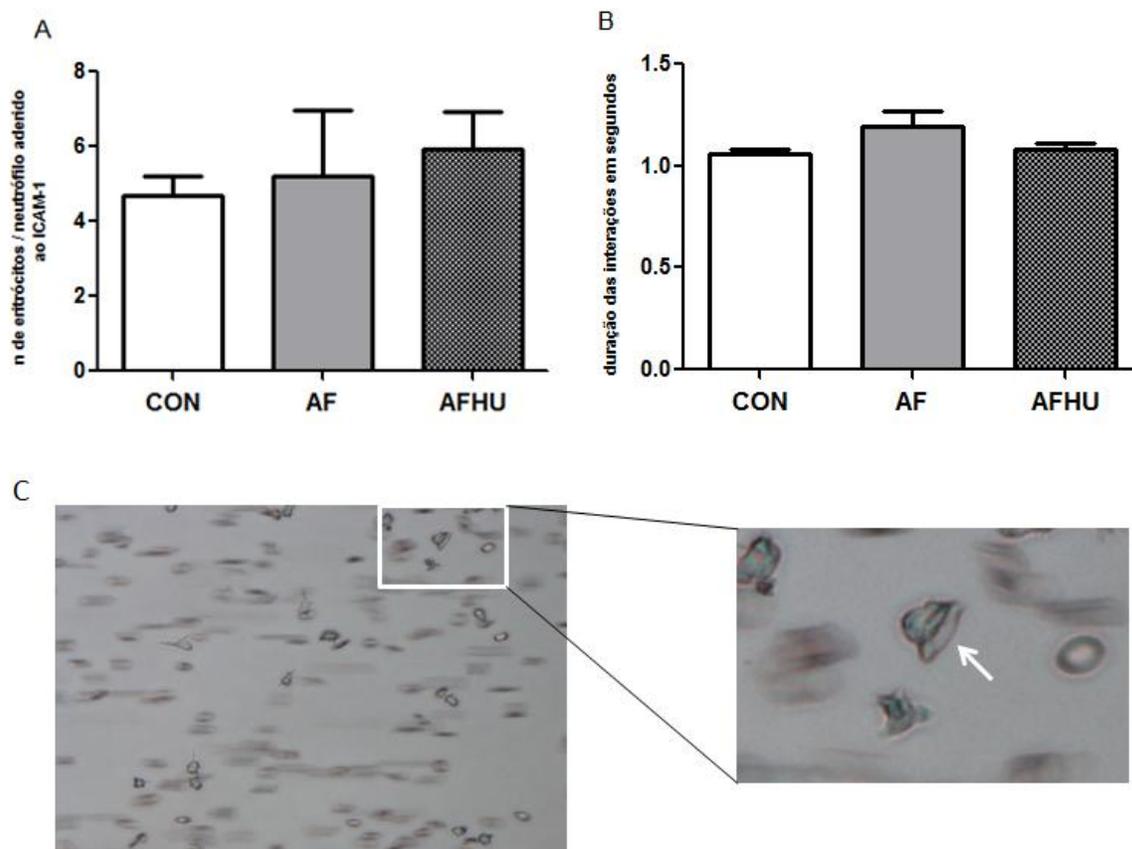
**Figura 13.** Média do número de interações de hemácias ( $1 \times 10^7$  células/mL) por neutrófilo não-autólogo ( $5 \times 10^6$  células/mL) aderido a HUVECs cultivadas no biochip; Neutrófilos foram permitidos a aderir por 2 minutos ( $0,7 \text{ d/cm}^2$ ) e, em seguida, foram adicionadas hemácias em fluxo por 2 minutos ( $0,3 \text{ d/cm}^2$ ) e avaliadas as interações heterotípicas. Células provenientes de controles (CON, n=10) e pacientes AF (AF, n=10);  $P > 0,05$ .

#### 6.1.11 Interação de células vermelhas a neutrófilos previamente aderidos à proteína ICAM-1 ou E-selectina

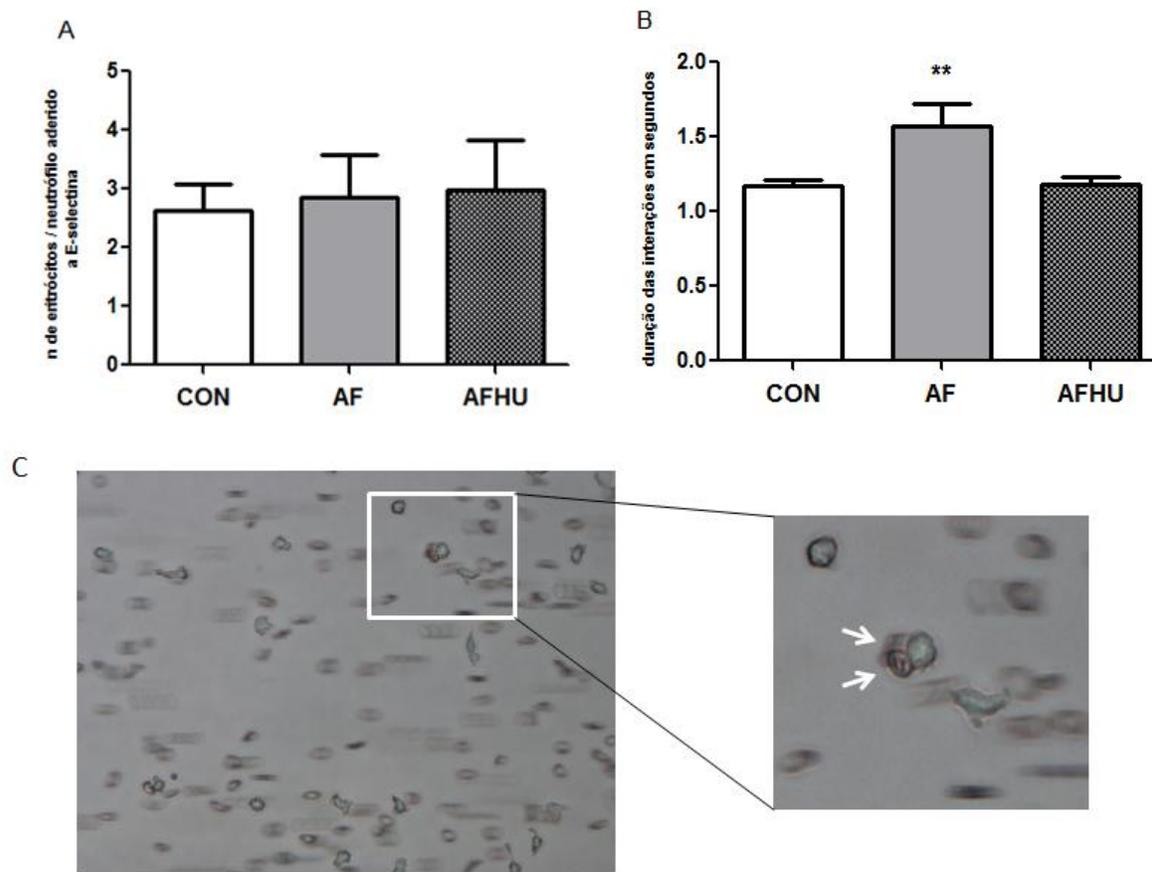
Avaliamos as interações de hemácias com neutrófilos aderidos às principais moléculas de adesão expressas no endotélio: ICAM-1 e E-selectina. Neutrófilos de pacientes com AF e controles foram dispensados nos canais por 2 minutos ( $0,7 \text{ d/cm}^2$ ), para permitir a adesão à parede do microcapilar e, em seguida, hemácias autólogas foram perfundidas por mais 2 minutos ( $0,3 \text{ d/cm}^2$ ) pelos microcanais para observação da ocorrência das interações. Não foram observadas diferenças significativas quanto ao

número e duração (em segundos) das interações de hemácias com os neutrófilos previamente aderidos à proteína ICAM-1, nos grupos controle e pacientes com AF com e sem a terapia com HU (Figura 14).

Também avaliamos as interações de hemácias com neutrófilos aderidos à proteína recombinante humana E-selectina (2 $\mu$ g/mL) entre os grupos de pacientes com AF com e sem a terapia com HU e indivíduos controle. Da mesma forma que nos experimentos utilizando a ICAM-1 como ligante, não observamos diferenças quanto ao número de interações de hemácias por neutrófilo aderido à E-selectina nos grupos avaliados (Figura 15 A). Contudo, quando quantificada a duração das interações heterotípicas em neutrófilos aderidos à proteína E-selectina, observamos que a duração das interações entre células provenientes de pacientes AF é significativamente maior comparada aos grupos controle e pacientes AF em terapia com HU (Figura 15 B).



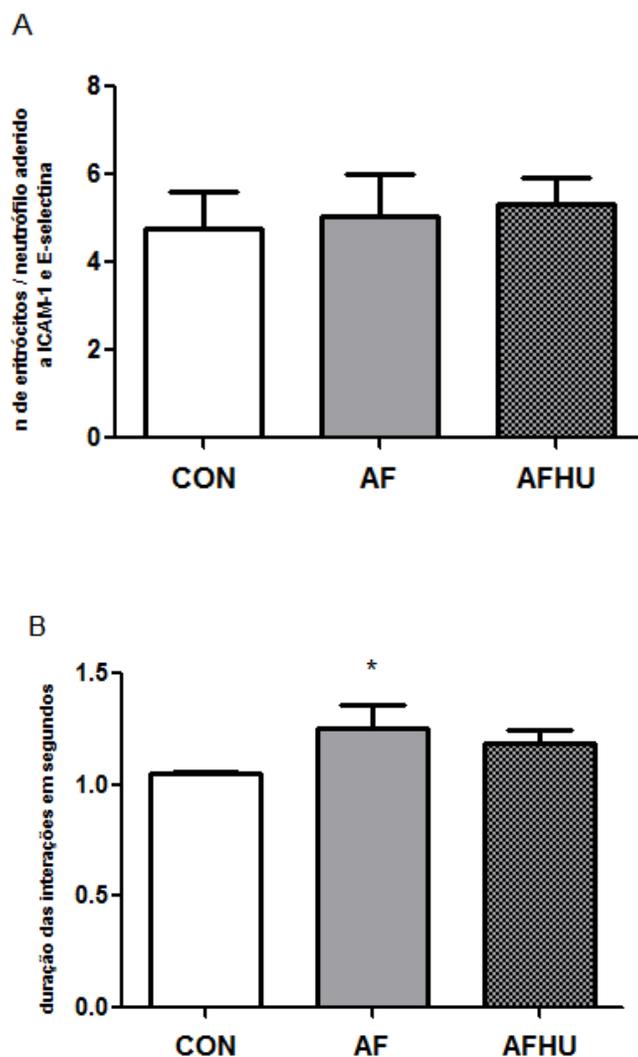
**Figura 14.** (A) Média do número de interações de hemácias ( $1 \times 10^7$  /mL) com neutrófilos autólogos ( $5 \times 10^6$  /mL) aderidos a proteína recombinante ICAM-1 ( $10 \mu\text{g}/\text{mL}$ ) nos microcanais dos biochips; (B) Duração em segundos da captura de hemácias por estes neutrófilos;  $P > 0.05$ . Neutrófilos foram permitidos a aderir por 2 minutos ( $0,7 \text{ d}/\text{cm}^2$ ) e, em seguida, foram adicionadas hemácias em fluxo por mais 2 minutos ( $0,3 \text{ d}/\text{cm}^2$ ). Células provenientes de Controle (CON,  $n=08$ ), pacientes AF (AF,  $n=05$ ) e pacientes AFHU (AFHU,  $n=05$ ); (C) Imagem adquirida com objetiva de magnificação de 40X, de neutrófilos aderidos a ICAM-1 e hemácias em fluxo e representação em maior aumento (quadrante branco - imagem ampliada em 12 X) da interação neutrófilo-hemácia; seta branca apontando hemácia.



**Figura 15.** (A) Média do número de interações de hemácias ( $1 \times 10^7$  /mL) com neutrófilos autólogos ( $5 \times 10^6$  /mL) aderidos a proteína recombinante E-selectina ( $2 \mu\text{g}/\text{mL}$ ) nos microcanais dos biochips; (B) Duração em segundos da captura de hemácias por estes neutrófilos; \*\* $P < 0.01$  comparado ao grupo controle, de acordo com ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni. Neutrófilos foram permitidos a aderir por 2 minutos ( $0,7 \text{ d}/\text{cm}^2$ ) e, em seguida, foram adicionadas hemácias em fluxo por mais 2 minutos ( $0,3 \text{ d}/\text{cm}^2$ ). Células provenientes de Controle (CON,  $n=10$ ), pacientes AF (AF,  $n=06$ ) e pacientes AFHU (AFHU,  $n=05$ ); (C) Imagem adquirida com objetiva de magnificação de 40X, de neutrófilos aderidos a E-selectina e hemácias em fluxo e representação em maior aumento (quadrante branco – imagem ampliada em 12X) da interação neutrófilo-hemácias; seta branca apontando as hemácias.

#### 6.1.12 Interação de células vermelhas a neutrófilos previamente aderidos às proteínas ICAM-1 e E-selectina

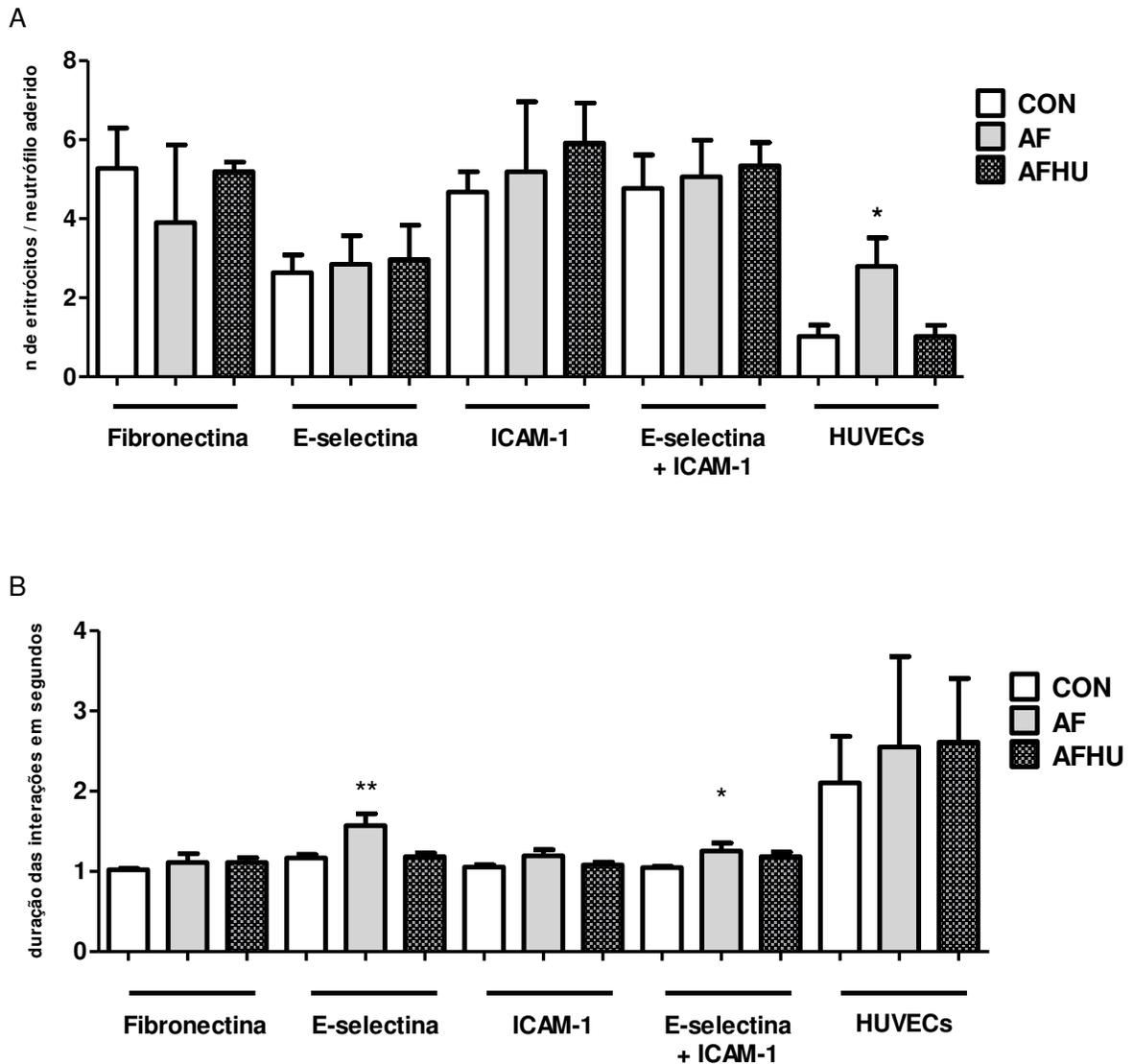
Quantificamos as interações de hemácias com neutrófilos aderidos às proteínas recombinantes ICAM-1 (10 µg/mL) e E-selectina (2 µg/mL), quando incubadas juntas no biochip. No entanto, não foram observadas diferenças quanto ao número de interações de hemácias por neutrófilo aderido a estas proteínas entre os grupos de pacientes AF e controle (Figura 16 A). Ao avaliarmos a duração destas interações heterocelulares, observamos que assim como nos experimentos com somente a E-selectina, hemácias provenientes de pacientes AF sem tratamento com HU interagem por mais tempo com neutrófilos autólogos aderidos aos ligantes ICAM-1 e E-selectina, quando comparadas ao grupo controle (Figura 16 B).



**Figura 16.** (A) Média da duração das interações de hemácias ( $1 \times 10^7$  /mL) por neutrófilo autólogo ( $5 \times 10^6$  /mL) aderido às proteínas recombinantes E-selectina ( $2 \mu\text{g}/\text{mL}$ ) e ICAM-1 ( $10 \mu\text{g}/\text{mL}$ ) (biochips recobertos com ambas as proteínas ICAM-1 e E-selectina); (B) Duração em segundos da captura de hemácias por estes neutrófilos; \* $P < 0.05$ , comparado ao grupo controle, de acordo com ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni. Neutrófilos foram permitidos a aderir por 2 minutos ( $0,7 \text{ d}/\text{cm}^2$ ) e, em seguida, foram adicionadas hemácias em fluxo por mais 2 minutos ( $0,3 \text{ d}/\text{cm}^2$ ). Células provenientes de Controle (CON,  $n=08$ ), pacientes AF (AF,  $n=05$ ) e pacientes AF em terapia com HU (AFHU,  $n=05$ ).

### 6.1.13 Resumo das interações de células vermelhas com neutrófilos aderidos a diferentes ligantes e a células endoteliais HUVECs

Agrupamos em gráficos o número das interações de células vermelhas com neutrófilos aderidos às proteínas recombinantes já avaliadas: E-selectina, ICAM-1, E-selectina + ICAM-1, e células endoteliais do tipo HUVEC (Figura 17 A), bem como a duração em segundos destas interações (Figura 17 B). Observando os gráficos com o resumo das interações, é possível sugerir que, comparado às proteínas recombinantes, o número de interações heterocelulares neutrófilo-eritrócitos parece ser menor quando os neutrófilos estão aderidos a HUVECs, entretanto, a duração destas interações parece ser maior, isto é, interações mais estáveis quando estes neutrófilos estão aderidos a estas células.



**Figura 17.** (A) Média do número e (B) duração de interações de hemácias ( $1 \times 10^7$  células/mL) com neutrófilos autólogos ( $5 \times 10^6$  células/mL) aderidos às proteínas recombinantes E-selectina ( $2 \mu\text{g/mL}$ ;  $n \geq 05$ ), ICAM-1 ( $10 \mu\text{g/mL}$ ;  $n \geq 05$ ), E-selectina + ICAM-1 ( $n \geq 05$ ) e HUVECs (human vein endothelial cells –  $1 \times 10^7$  células/mL;  $n \geq 09$ ), no biochip. Neutrófilos foram permitidos a aderir por 2 minutos ( $0,7 \text{ d/cm}^2$ ) e, em seguida, foram adicionadas hemácias em fluxo por mais 2 minutos ( $0,3 \text{ d/cm}^2$ ). Células provenientes de Controle (CON), pacientes AF (AF) e pacientes AF em terapia com HU (AFHU); \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , comparado ao respectivo controle, de acordo com ANOVA, seguido pelo teste de Bonferroni.

6.2 Subprojeto 2: Avaliação dos agregados heterocelulares circulantes de neutrófilos no sangue periférico, utilizando a tecnologia de citometria de fluxo com imagem

Verificamos, através da tecnologia de citometria de fluxo com imagem (*Amnis ImageStreamX MKII, Seattle, USA*), a presença de agregados de neutrófilo-plaqueta e neutrófilo-eritrócito no sangue periférico obtido de pacientes com anemia falciforme (AF) e indivíduos saudáveis, que foram recrutados no ambulatório de hemoglobinopatias do National Heart Lung and Blood Institute (NHLBI, NIH – Bethesda, MD). Os controles foram pareados de acordo com o sexo ou idade quando possível. Os dados clínicos dos pacientes AF americanos utilizados neste estudo encontram-se na Tabela 2.

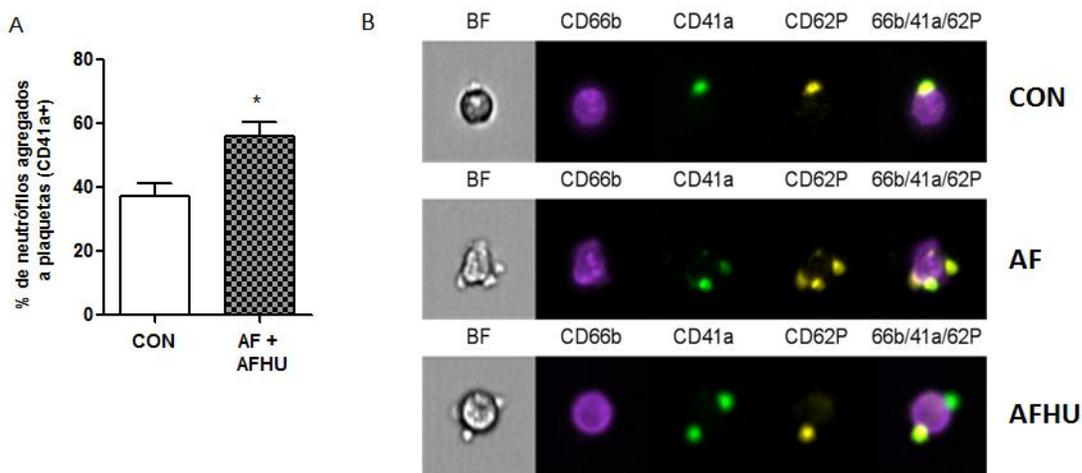
**Tabela 2. Detalhes clínicos dos pacientes participantes deste estudo (população americana – NHLBI, NIH, USA)**

	AF	AFHU
<b>Homem/Mulher</b>	3/5	6/14
<b>Idade (anos)</b>	29,7 (33; 21; 34)	47,4 (50,5; 27; 62)
<b>Células vermelhas (<math>10^{12}/L</math>)</b>	2,9 (2,8; 2,2; 3,7)	2,26 (2,1; 1,7; 3,1)
<b>Hematócrito (%)</b>	24,4 (23,7; 18,6; 23,6)	24,3 (24,8; 19,5; 30,1)
<b>Hemoglobina (g/L)</b>	8,4 (8,1; 6,8; 9,6)	8,5 (8,5; 6,5; 10,9)
<b>Vol. Corpuscular médio (fl)</b>	84,8 (84,2; 74,1; 97,7)	108,6 (111; 78; 133,2)
<b>Reticulócitos (%)</b>	14,1 (11,6; 6,5; 22)	7,2 (6; 3,5; 13,7)
<b>Contagem leucócitos (<math>10^9/L</math>)</b>	9,5 (9,7; 7,8; 11)	6,4 (5,9; 3,1; 12,7)
<b>Contagem plaquetas (<math>10^9/L</math>)</b>	353 (359; 125; 530)	411,3 (314,5; 104; 1750)
<b>HbF (%)</b>	7,9 (7,5; 2,2; 13,7)	18,15 (19,9; 2,9; 29,9)

Com exceção do sexo, todos os dados estão representados como média (mediana; mínimo; máximo) valores para pacientes com AF em estado estável (AF), pacientes AF em terapia com HU (AFHU; 15–30 mg/kg/d). HbF, hemoglobina fetal.

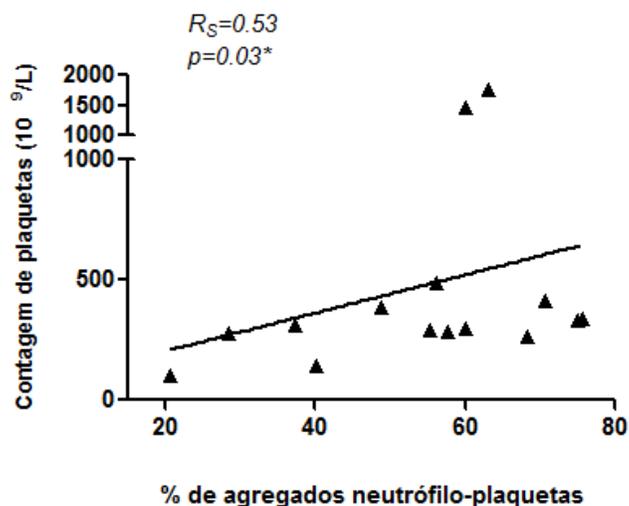
### 6.2.1 Porcentagem de agregados heterocelulares de neutrófilo-plaqueta *in vitro* de controles e pacientes AF

Quantificamos a porcentagem de neutrófilos agregados a plaquetas com células provenientes do sangue periférico de pacientes AF (com e sem a terapia de HU) e controles, realizando a lise de hemácias e, em seguida, analisando pelo citômetro de fluxo com imagem, através da marcação com anticorpos fluorescentes para identificação de neutrófilos e plaquetas (Figura 18 A e B). A porcentagem de neutrófilos CD66b+ agregados a plaquetas CD41a+ encontrados no sangue periférico de pacientes AF em uso ou não da terapia com HU, foi significativamente maior comparada a de indivíduos controles (Figura 18 A).



**Figura 18.** (A) Porcentagem de neutrófilos (CD66b+) agregados a plaquetas (CD41a+) de células obtidas do sangue periférico de indivíduos saudáveis (Controle, n=12), pacientes com AF com/sem uso de HU (AF, n=15), identificados pela citometria de fluxo com imagem através da marcação com anticorpos fluorescentes contra proteínas de superfície de neutrófilos e plaquetas.  $***P < 0.01$ , comparado ao grupo controle, de acordo com teste de Mann-Whitney. (B) Imagens representativas de neutrófilo CD66b+ (roxo) agregado a plaquetas CD41a+ (verde) ativadas CD62P+ (amarelo); 66b/41a/62P= imagens sobrepostas (*merged*). Células provenientes de controle (CON) e paciente AF sem (AF) e com a terapia de HU (AFHU).

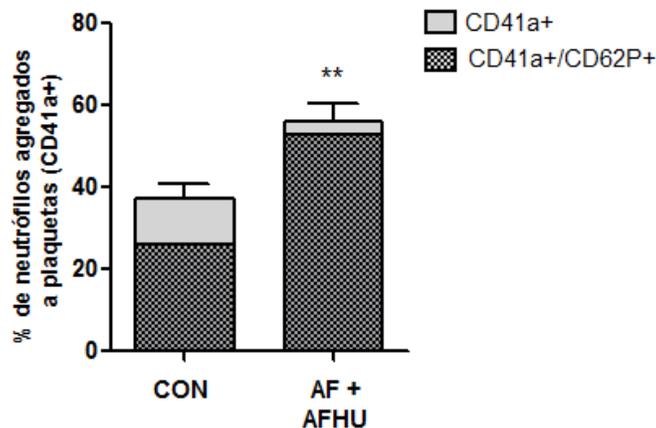
A contagem de plaquetas no sangue periférico dos pacientes AF, em uso ou não de HU, se correlacionou positivamente com a porcentagem de agregados neutrófilo-plaqueta (Figura 19).



**Figura 19.** Correlação do número absoluto de plaquetas com a porcentagem de agregados de neutrófilo-plaqueta presentes no sangue periférico de pacientes AF;  $R_s = 0.53$ ;  $*P < 0.05$ , correlação não-paramétrica de Spearman;  $n = 15$ .

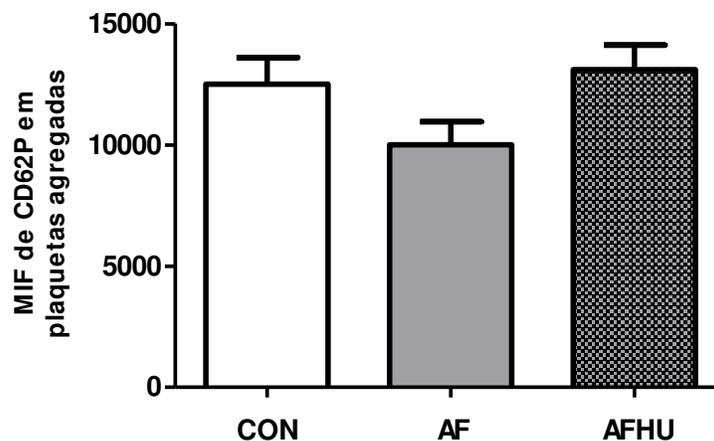
#### 6.2.2 Agregados heterocelulares de neutrófilos a plaquetas ativadas (CD62P+) e a expressão de P-selectina na superfície das plaquetas agregadas

Quantificamos a porcentagem de neutrófilos agregados a plaquetas ativadas, isto é, plaquetas positivas para a molécula P-selectina (CD62P+) em sua superfície, no sangue periférico de pacientes AF (com e sem a terapia de HU) e controles. Neutrófilos CD66b+ de pacientes AF estavam significativamente mais agregados a plaquetas ativadas, expressando P-selectina, comparados aos neutrófilos de indivíduos controles (Figura 20).



**Figura 20.** Porcentagem de neutrófilos (CD66b+) agregados a plaquetas ativadas (CD41a+/CD62P+) provenientes do sangue periférico de indivíduos saudáveis (Controle, n=12) e pacientes com anemia falciforme com/sem uso de HU (AF, n=15), identificados pela citometria de fluxo com imagem através da marcação de anticorpos fluorescentes contra proteínas de superfície de neutrófilos e plaquetas. \*\*P<0.01, comparado ao grupo controle, de acordo com teste de Mann-Whitney.

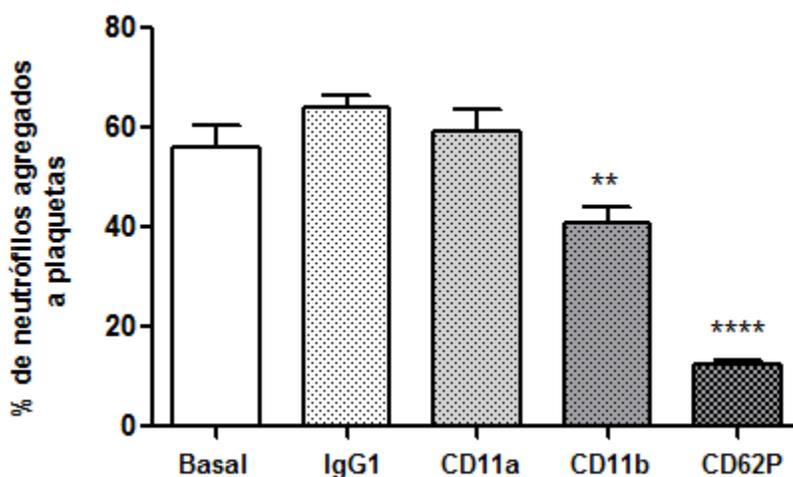
A expressão de CD62P (P-selectina) na superfície de plaquetas agregadas aos neutrófilos foi avaliada e, no entanto, não foi encontrada diferença entre a média de intensidade de fluorescência nos grupos de controle e pacientes AF em uso ou não da terapia com HU (Figura 21).



**Figura 21.** Média de intensidade de fluorescência (MFI) da molécula CD62P (P-selectina) expressa em plaquetas (CD41a+) agregadas aos neutrófilos (CD66b+) *in vitro*, de indivíduos saudáveis (CON, n=12), pacientes com anemia falciforme sem uso de HU (AF, n=05) e pacientes com anemia falciforme em terapia com HU (AFHU, n=10).

### 6.2.3 Identificação das moléculas de adesão envolvidas nos agregados de neutrófilo-plaqueta em pacientes AF

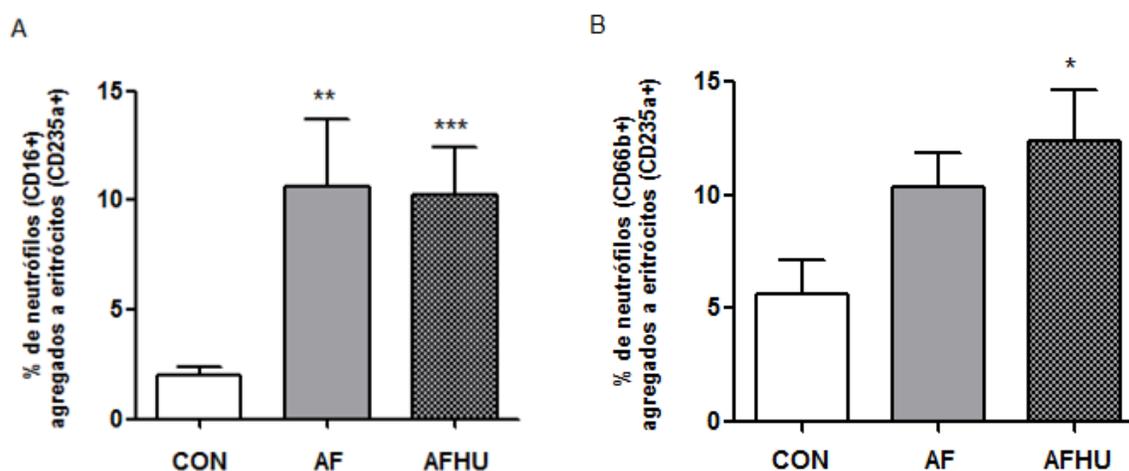
Avaliamos as possíveis moléculas de adesão envolvidas nos agregados neutrófilo-plaquetas no sangue periférico de pacientes AF em uso ou não de HU, utilizando anticorpos bloqueadores de função das integrinas CD11a (LFA-1), CD11b (Mac-1), que são integrinas  $\beta_2$  expressas em neutrófilos e da molécula CD62P (P-selectina) expressa em plaquetas. Após a incubação com anticorpos bloqueadores destas proteínas, quantificamos o número de agregados neutrófilo-plaqueta, através da citometria de fluxo com imagem. Observamos ao bloquear a integrina Mac-1 bem como a molécula P-selectina, uma redução significativa da porcentagem de agregados de neutrófilo-plaqueta no sangue destes pacientes comparada ao controle isotópico, sugerindo que estas moléculas estariam envolvidas na formação das interações de neutrófilo-plaqueta nestes pacientes (Figura 22).



**Figura 22.** Porcentagem de neutrófilos agregados a plaquetas em pacientes AF + AFHU ( $n \geq 05$ ) após incubação das células com IgG1=controle isotópico, anticorpos bloqueadores de função das moléculas CD11a (LFA-1), CD11b (Mac-1), expressas em neutrófilos e anti-CD62P (P-selectina) expressa em plaquetas; \*\* $P < 0.01$ , \*\*\*\* $P < 0.0001$ , de acordo com teste t pareado, comparado ao controle isotópico.

#### 6.2.4 Porcentagem de agregados heterocelulares de neutrófilo-células vermelhas *in vitro* no sangue periférico de controles e pacientes AF

Realizamos alguns experimentos, utilizando a citometria de fluxo convencional (BD FACSCalibur, BD Pharmingen, USA) com controles e pacientes AF recrutados no hemocentro da UNICAMP, a fim de padronizarmos e identificarmos agregados de neutrófilos a células vermelhas no sangue periférico por esta técnica. Também verificamos a presença destes agregados no sangue periférico de controles e pacientes AF oriundos do ambulatório de hemoglobinopatias do NIH, USA, utilizando a tecnologia da citometria de fluxo com imagem. Em ambas as populações (brasileira e americana) e tecnologias (citometria de fluxo convencional e com imagem) foram identificadas maiores porcentagens de neutrófilos agregados a células vermelhas no sangue periférico de pacientes AF (em uso ou não da hidroxiureia na citometria de fluxo convencional – Figura 23 A) e pacientes AFHU (citometria de fluxo com imagem – Figura 23 B) comparadas as porcentagens observadas em células provenientes de indivíduos saudáveis.

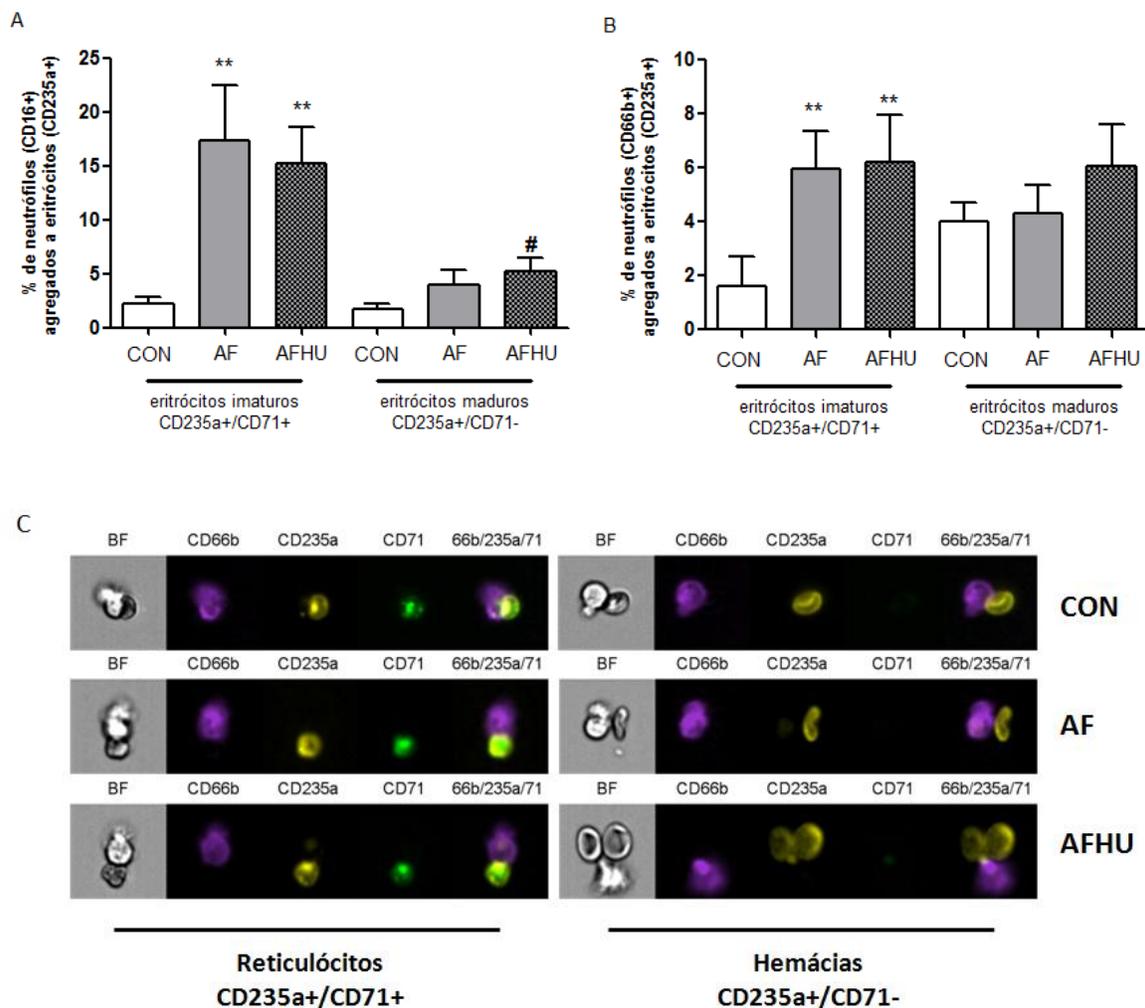


**Figura 23.** (A) Porcentagem de neutrófilos (CD16b+) agregados a células vermelhas no sangue periférico de indivíduos saudáveis (CON, n=09) e pacientes AF sem (AF, n=08) e com a terapia com HU (AFHU, n=07) brasileiros, detectada pela citometria de fluxo convencional; (B) Porcentagem de neutrófilos (CD66b+) agregados a células vermelhas no sangue periférico de indivíduos saudáveis (CON, n=11) e pacientes AF sem (AF, n=09) e com a terapia com HU (AF, n=14) americanos, detectado pela citometria de fluxo com imagem; \*P<0.05, \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001, comparado ao respectivo grupo controle, de acordo com teste de *Kruskal-Wallis* seguido pelo teste de *Dunn*.

#### 6.2.5 Identificação das células vermelhas presentes nos agregados heterocelulares de neutrófilo-células vermelhas

Avaliamos qual tipo de célula vermelha estaria mais envolvida nestes agregados heterotípicos, de acordo com o estágio de maturação destas células, utilizando a marcação fluorescente positiva para CD71, marcador para transferrina, expresso preferencialmente na superfície de células vermelhas imaturas (reticulócitos).

Observamos que pacientes AF, com e sem o uso da hidroxiureia, em ambas as populações brasileira e americana (Figura 24 A e B, respectivamente), demonstraram uma maior porcentagem de neutrófilos agregados a reticulócitos comparada a de controles, sugerindo uma maior participação de eritrócitos imaturos (reticulócitos) na formação destes agregados. A porcentagem de hemácias agregadas aos neutrófilos também foi maior no grupo de pacientes AFHU comparada ao grupo controle na população brasileira e, apesar de não ter sido significativa, observou-se uma tendência a uma maior porcentagem de agregados de neutrófilo-células vermelhas maduras no grupo de pacientes AFHU na população americana.



**Figura 24.** (A) Porcentagem de neutrófilos (CD16b+) agregados a células vermelhas no sangue periférico de indivíduos saudáveis (CON, n=09) e pacientes AF sem (AF, n=08) e com a terapia com HU (AFHU, n=07) brasileiros, detectada pela citometria de fluxo convencional; (B) Porcentagem de neutrófilos (CD66b+) agregados a células vermelhas no sangue periférico de indivíduos saudáveis (CON, n=11) e pacientes AF sem (AF, n=09) e com a terapia com HU (AF, n=14) americanos, detectado pela citometria de fluxo com imagem; #P<0.05, \*\*P<0.01, comparado ao respectivo grupo controle, de acordo com teste de *Kruskal-Wallis* seguido pelo teste de *Dunn*; (C) Imagens representativas em campo claro (BF) e imagens fluorescentes, adquiridas pela citometria de fluxo por imagem, de neutrófilos CD66b+ (cor roxa) agregados a reticulócitos (CD235a+ = cor amarela; CD71+ = cor verde) ou hemácias (CD235a+ = cor amarela; CD71-); CD66b/CD235a/CD71= imagens sobrepostas (merged). Células provenientes do sangue periférico de controles (CON), pacientes AF sem (AF) e com terapia de HU (AFHU).

### 6.2.6 Expressão das integrinas $\beta_2$ : LFA-1 (CD11a), Mac-1 (CD11b) e da proteína CD66b na superfície de neutrófilos

Avaliamos a expressão das subunidades  $\alpha$  das integrinas LFA-1 (CD11a) e Mac-1 (CD11b) e de CD66b (proteína específica de granulócitos) na superfície dos neutrófilos de pacientes AF e indivíduos controles agregados e não-agregados às células vermelhas (Tabela 3). A porcentagem de neutrófilos positivos para estas moléculas foi de aproximadamente 100%, então nós quantificamos a média de intensidade de fluorescência (MIF) destas células. Analisamos os neutrófilos não agregados a hemácias (*neutrófilos single*), neutrófilos agregados a eritrócitos (*neut-eritrócitos*), agregados a eritrócitos imaturos (neut-reticulócitos) e agregados a hemácias (*neut-hemácias*) dos indivíduos do estudo. Observamos diferença significativa apenas na expressão da subunidade  $\alpha$  da integrina LFA-1 nos neutrófilos não-agregados de pacientes AF em tratamento com HU comparados aos de controles ( $P < 0.05$ ), entretanto não observamos diferenças quanto à expressão de ambas as integrinas  $\beta_2$  e da proteína CD66b nos agregados heterocelulares de neutrófilo-células vermelhas entre pacientes AF e controles (Tabela 3).

**Tabela 3. Média de intensidade de fluorescência das integrinas  $\beta_2$ : LFA-1 (CD11a), Mac-1 (CD11b) e da proteína CD66b na superfície de neutrófilos**

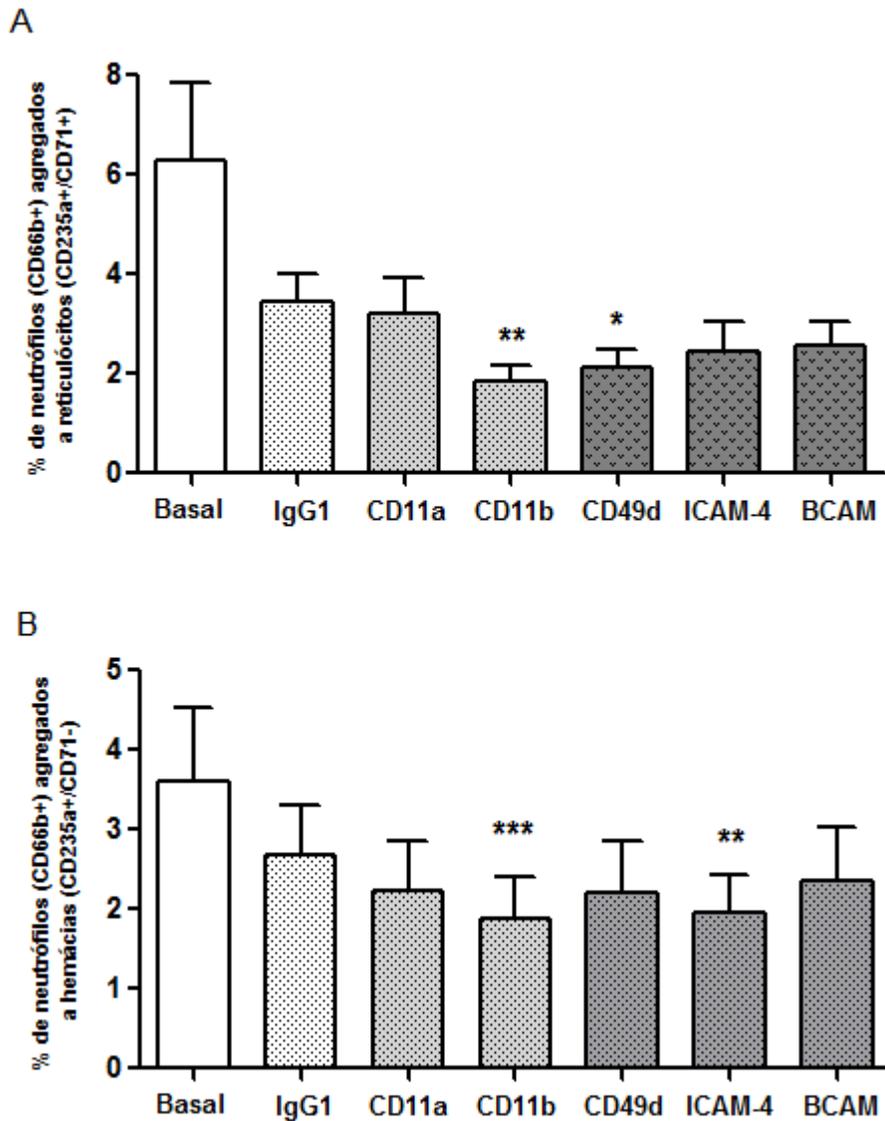
	CON	AF	AFHU	valor de P
<b>CD11a</b>				
Neutrófilos single	25.253 ( $\pm$ 2.271)	29.080( $\pm$ 2.674)	33.380 ( $\pm$ 3.059)	*p<0.05
Neut-eritrócitos	31.083( $\pm$ 2.764)	34.993( $\pm$ 2.830)	40.467( $\pm$ 4.844)	NS
Neut-reticulócitos	41.360( $\pm$ 5.933)	37.396( $\pm$ 3.240)	40.631( $\pm$ 4.821)	NS
Neut-hemácias	29.879( $\pm$ 2.734)	31.524( $\pm$ 2.671)	38.480( $\pm$ 5.245)	NS
<b>CD11b</b>				
Neutrófilos single	40.888( $\pm$ 2.435)	41.746( $\pm$ 3.943)	43.577( $\pm$ 4.306)	NS
Neut-eritrócitos	43.491( $\pm$ 2.560)	44.065( $\pm$ 4.396)	46.121( $\pm$ 4.609)	NS
Neut-reticulócitos	51.168( $\pm$ 3.099)	44.365( $\pm$ 4.309)	46.788( $\pm$ 4.885)	NS
Neut-hemácias	41.766( $\pm$ 2.703)	42.845( $\pm$ 4.446)	44.747( $\pm$ 4.735)	NS
<b>CD66b</b>				
Neutrófilos single	40.527( $\pm$ 3.384)	42.725( $\pm$ 6.828)	46.345( $\pm$ 5.235)	NS
Neut-eritrócitos	40.601( $\pm$ 3.611)	43.089( $\pm$ 6.762)	47.738( $\pm$ 4.675)	NS
Neut-reticulócitos	41.698( $\pm$ 4.158)	43.711( $\pm$ 6.974)	48.416( $\pm$ 5.008)	NS
Neut-hemácias	40.581( $\pm$ 4.244)	41.796( $\pm$ 6.266)	43.894( $\pm$ 4.233)	NS

Média de intensidade de fluorescência (MIF)  $\pm$  erro padrão da média (SEM) das moléculas de adesão CD11a (LFA-1), CD11b (Mac-1) e CD66b na superfície de neutrófilos de indivíduos saudáveis (controle, n=09), pacientes com anemia falciforme sem uso de HU (AF, n=08) e pacientes com anemia falciforme em terapia com HU (AFHU, n=12); Valores de P comparam os grupos AF e AFHU com o grupo controle. \*P<0.05, AFHU comparado ao grupo controle, de acordo com Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Dunn. Neutrófilos single = neutrófilos solitários não agregados a outras células; neut-eritrócitos= neutrófilos agregados às células vermelhas maduras e imaturas; neut-reticulócitos= neutrófilos agregados a reticulócitos; neut-hemácias = neutrófilos agregados a hemácias.

### 6.2.7 Identificação das moléculas de adesão envolvidas nos agregados de neutrófilo-células vermelhas em pacientes AF

Verificamos as possíveis moléculas de adesão envolvidas nos agregados de neutrófilos com células vermelhas, através do uso de anticorpos bloqueadores de função da molécula e inibidor contra algumas proteínas de adesão expressas na superfície destas células e, em seguida, quantificamos a porcentagem dos agregados heterocelulares.

Utilizamos anticorpos bloqueadores contra as integrinas CD11a (LFA-1) e CD11b (Mac-1) expressas nos neutrófilos, CD49d (VLA-4) expresso em reticulócitos, BCAM (subunidade da molécula Lu/BCAM) e o peptídeo inibidor de ICAM-4, ambas proteínas expressas em eritrócitos maduros e imaturos. Pacientes AF em terapia ou não da HU apresentaram porcentagens semelhantes de agregados neutrófilo-células vermelhas, então agrupamos os dois grupos em um único grupo de pacientes AF. Observamos que o bloqueio das moléculas CD11b, expressa em neutrófilos, e CD49d, expressa em reticulócitos, reduziu significativamente a porcentagem de agregados de neutrófilo-reticulócitos no sangue periférico de pacientes AF comparada ao controle isotópico (Figura 25 A). Ao bloquear CD11b, expressa em neutrófilos, e ICAM-4, que pode ser expresso em células vermelhas imaturas ou maduras, observamos uma redução significativa da porcentagem de agregados neutrófilo-hemácias nos pacientes com anemia falciforme comparada ao respectivo controle isotópico (Figura 25 B).



**Figura 25.** Porcentagem de neutrófilos agregados a (A) reticulócitos ou (B) hemácias em pacientes AF + AFHU após incubação das células com IgG1=controle isotípico, anticorpos bloqueadores de função das moléculas CD11a (LFA-1), CD11b (Mac-1), expressas em neutrófilos; anti-CD49d (VLA-4) expressa em reticulócitos; ICAM-4 e BCAM que são expressas em eritrócitos maduros ou imaturos;  $n \geq 12$ ; \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ , comparado ao respectivo controle isotípico (IgG1) de acordo ANOVA seguido pelo teste de Friedman.

#### 6.2.8 Correlação da porcentagem de agregados de neutrófilo-células vermelhas encontrados no sangue periférico de pacientes AF + AFHU

Correlacionamos à porcentagem de agregados de neutrófilo-células vermelhas (reticulócitos e hemácias) encontrada no sangue periférico de pacientes AF em terapia ou não da HU, alguns parâmetros hematológicos coletados no mesmo dia do ensaio realizado com amostras destes pacientes (Tabela 4). Observamos que a porcentagem de hemoglobina fetal (HbF) presente no sangue periférico dos pacientes AF + AFHU correlacionou-se inversamente à porcentagem de agregados de neutrófilo-células vermelhas e esta correlação foi melhor observada quando foi avaliada a porcentagem de agregados de neutrófilo-reticulócitos. É importante a observação de que tanto a contagem de células vermelhas quanto de reticulócitos não se correlacionou com a porcentagem de agregados de neutrófilos a células vermelhas. Interessantemente, a contagem de plaquetas no sangue periférico de pacientes AF +AFHU correlacionou-se de forma positiva com a porcentagem de agregados de neutrófilo-reticulócitos, sugerindo uma participação das plaquetas na formação de agregados de neutrófilos a células vermelhas.

**Tabela 4. Correlação da porcentagem de agregados de neutrófilo-células vermelhas no sangue periférico de pacientes AF + AFHU aos parâmetros hematológicos.**

	HbF (%)	Células Vermelhas $10^{12}/L$	Reticulócitos (%)	Leucócitos $10^9/L$	Neutrófilos $10^9/L$	Plaquetas $10^9/L$
<b>% de agregados de neutrófilo-eritrócitos</b>	$r^s=-0.552$ <u>P=0.022</u>	$r^s=0.329$ P=0.198	$r^s=0.194$ P=0.456	$r^s=-0.012$ P=0.963	$r^s=-0.039$ P=0.881	$r^s=0.318$ P=0.212
<b>% de agregados de neutrófilo-reticulócitos</b>	$r^s=-0.629$ <u>P=0.007</u>	$r^s=0.352$ P=0.166	$r^s=0.249$ P=0.335	$r^s=0.244$ P=0.345	$r^s=0.185$ P=0.477	$r^s=0.533$ <u>P=0.027</u>
<b>% de agregados de neutrófilo-hemácias</b>	$r^s=-0.069$ P=0.793	$r^s=0.123$ P=0.639	$r^s=-0.188$ P=0.468	$r^s=-0.356$ P=0.161	$r^s=-0.363$ P=0.152	$r^s=-0.081$ P=0.757

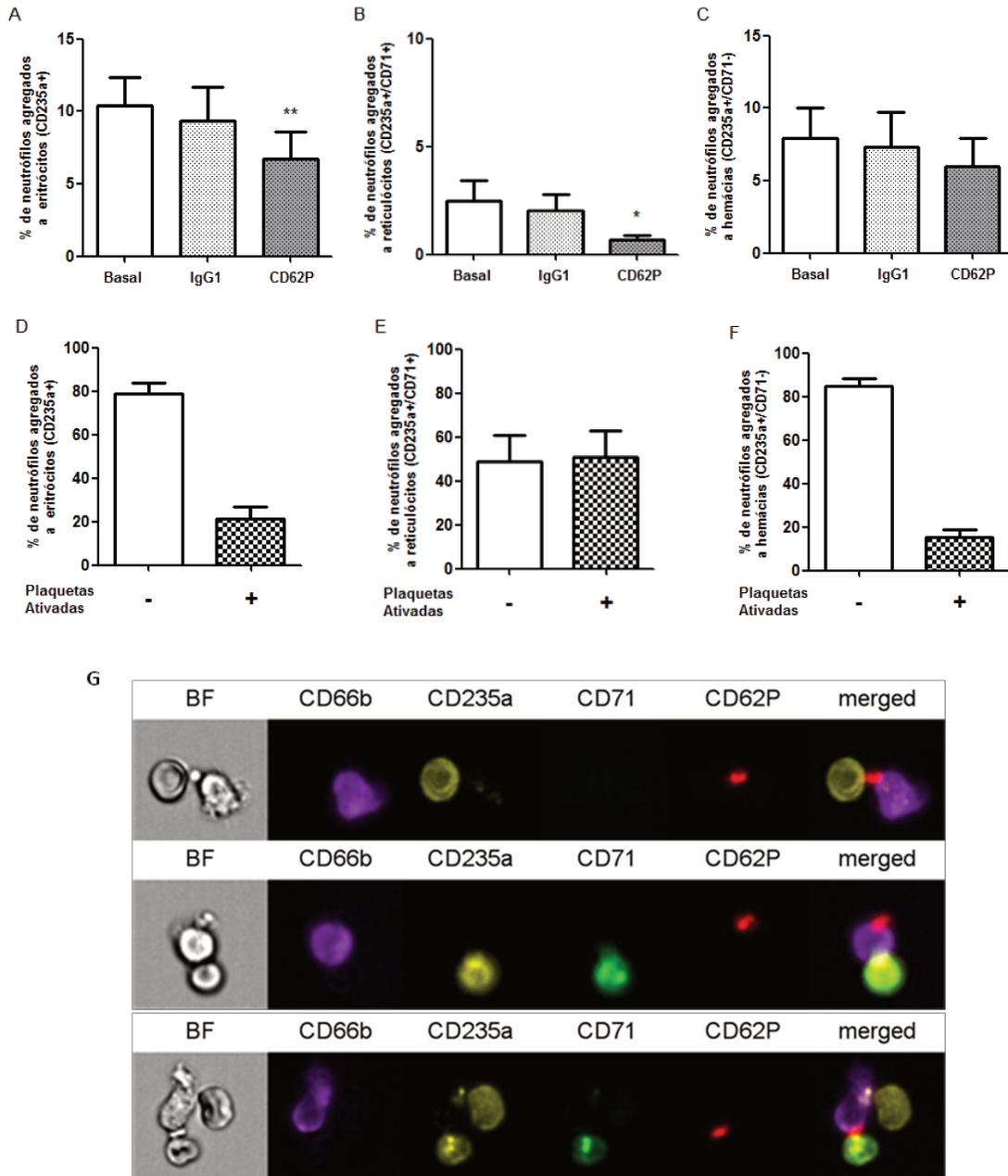
N=17 de pacientes AF + AFHU; As correlações foram calculadas usando o teste de *Spearman* ( $r^s$ ); os valores de  $P < 0.05$  estão sublinhados. HbF, hemoglobina fetal.

### 6.2.9 Investigação do papel das plaquetas na formação de agregados heterocelulares de neutrófilo-células vermelhas circulantes no sangue periférico de pacientes AF

Através da observação das imagens em campo claro adquiridas com a objetiva de 40X do citômetro de fluxo com imagem, verificamos que em alguns agregados de neutrófilo-células vermelhas, células ou partículas aparentando plaquetas estariam presentes entre estes agregados, ou aderidas aos neutrófilos agregados a células vermelhas. Diante disso, decidimos investigar se o bloqueio de plaquetas, através da incubação de células de pacientes AF (com ou sem uso da HU) com anticorpo bloqueador de função da P-selectina (CD62P), reduziria a formação de agregados neutrófilo-eritrócitos *in vitro*.

Verificamos que com o bloqueio da molécula P-selectina em plaquetas AF, houve uma redução significativa da formação de agregados de neutrófilo-células vermelhas (Figura 26 A) e neutrófilo-reticulócitos (Figura 26 B) e observamos uma tendência à redução da formação de agregados de neutrófilos-hemácias em células oriundas destes pacientes (Figura 26 C).

Incubamos as células provenientes dos pacientes AF (com/sem uso da HU) com anticorpos fluorescentes para a P-selectina, a fim de identificar, através das imagens adquiridas pelo citômetro de fluxo, a presença de plaquetas nos agregados de neutrófilos células-vermelhas. Os resultados demonstraram que as plaquetas participam em aproximadamente 20% de todos os agregados de neutrófilo-células vermelhas (Figura 26 D). Surpreendentemente, observamos que as plaquetas estão presentes em aproximadamente 50% dos agregados de neutrófilos-reticulócitos (Figura 26 E) e quase 20% dos agregados de neutrófilo-hemácias (Figura 26 F). As imagens adquiridas pela câmara do citômetro de fluxo confirmam a presença destas plaquetas (identificadas pela marcação fluorescente vermelha da P-selectina) nos agregados de neutrófilos-células vermelhas (Figura 26 G).

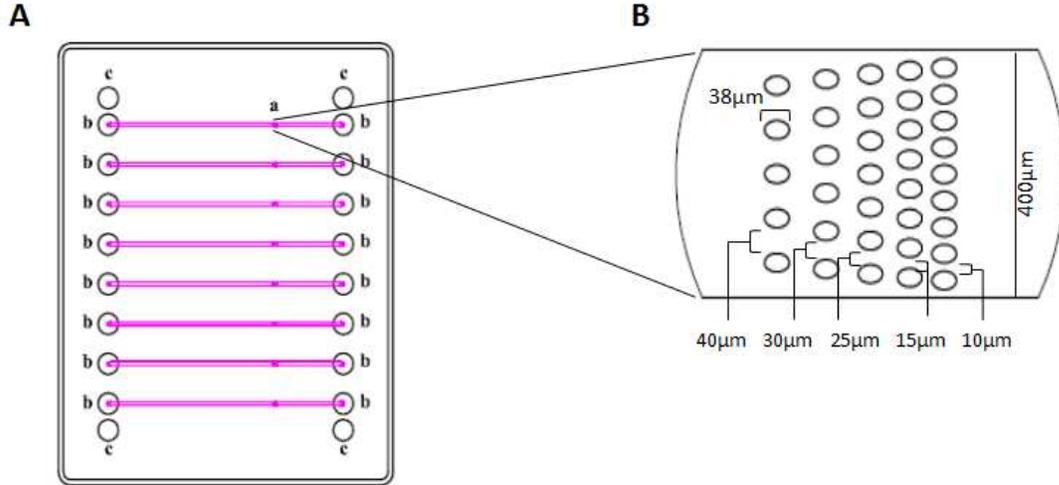


**Figura 26.** Porcentagem de neutrófilos agregados a (A) eritrócitos (CD235a+), (B) reticulócitos (CD235a+/CD71+) e (C) hemácias (CD235a+/CD71-) sob condições basais e após incubação do sangue periférico obtido de pacientes AF+AFHU com anticorpo IgG não específico ou anticorpo bloqueador de função da P-selectina (n=10); Porcentagem de neutrófilos agregados a células vermelhas (D) reticulócitos (E) e hemácias (F) demonstrando a presença (+) ou não (-) de plaquetas ativadas nestes agregados heterocelulares (n= 07); \*P<0.05, \*\*P<0.01, de acordo com ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni; (G) Imagens representativas do envolvimento das plaquetas (CD62P+= cor vermelha) nos agregados de neutrófilos (CD66b+= cor roxa) a células vermelhas positivas para glicoforina A (CD235a+= cor amarela) e para o receptor de transferrina = reticulócitos (CD71+ = cor verde). BF=campo claro e respectivos canais de fluorescência.

### 6.3 Subprojeto 3: Desenvolvimento de um biochip para estudo dos processos vaso-oclusivos utilizando a plataforma microfluídica VenaFlux

Com o intuito de desenvolver um ensaio *in vitro* mais relevante fisiologicamente para o estudo das interações celulares que ocorrem na microvasculatura e melhor compreensão dos processos vaso-oclusivos, nós desenvolvemos um novo desenho de biochip (Figura 27) para uso em nossa plataforma microfluídica (Cellix VenaFlux, Ltd., Dublin, Irlanda) que reproduz a geometria encontrada na rede de microcapilares *in vivo*.

O desenho feito nos microcapilares de biochips com 8 canais teve a colaboração da empresa Cellix Ltd. Através da inserção e disposição de pilares (com aproximadamente 38 $\mu$ m de diâmetro) nos canais de biochips com 400 $\mu$ m de diâmetro e 50 $\mu$ m de profundidade, foi possível reduzir o caminho percorrido pelas células em fluxo de 40 até 10 $\mu$ m de diâmetro, reproduzindo assim as anastomoses encontradas na microvasculatura *in vivo*. Os pilares foram dispostos em 5 colunas verticais, com intervalos entre cada coluna de aproximadamente 35 $\mu$ m. Os espaços entre os pilares em cada coluna reduzem proporcionalmente, isto é, os espaços laterais entre os pilares da primeira coluna são de 40  $\mu$ m enquanto os espaços laterais na última coluna são de 10  $\mu$ m (Figura 27 B). Nos microcanais dos biochips podem ser incubados diferentes ligantes que são expressos na matriz extracelular ou proteínas expressas no endotélio vascular.



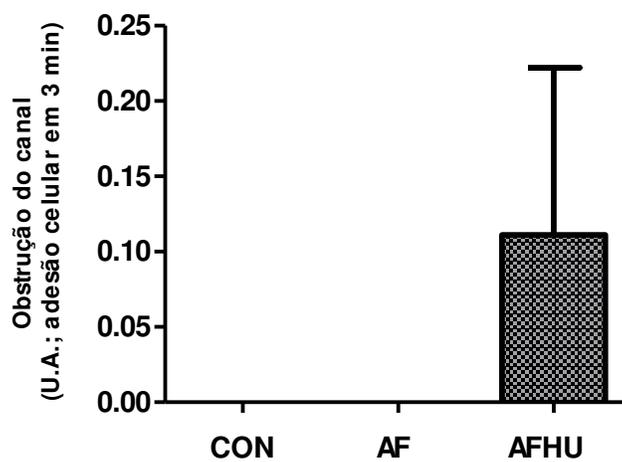
**Figura 27.** Desenho dos microcapilares do biochip. (A) Desenho esquemático do biochip com 8 canais com 400 μm de diâmetro e 50 μm de profundidade cada. O canal contém um único grupo de 5 colunas de pilares. (B) Seção ampliada do microcanal (vista de cima) demonstrando a disposição dos pilares em cada microcanal. Cada coluna de pilares está espaçada entre aproximadamente 35 μm. Cada pilar tem um diâmetro de aproximadamente 38 μm e os espaços entre os pilares diminuem proporcionalmente em cada coluna.

### 6.3.1 Obstrução dos microcanais do biochip com eritrócitos isolados de controles e pacientes AF

Avaliamos a habilidade deste biochip em monitorar as alterações das propriedades adesivas das células, investigando a dinâmica de fluxo de células vermelhas isoladas de controles (indivíduos saudáveis) e pacientes com AF em uso ou não da HU, pelos microcapilares.

Os microcanais do biochip foram incubados inicialmente com laminina, o principal ligante para o receptor da proteína BCAM/Lu (Bartolucci *et al.*, 2010) expressa nas células vermelhas, e então, eritrócitos de controles e pacientes AF foram dispensados aos microcanais a um shear stress de  $0,2 \text{ d/cm}^2$ , por 3 minutos. Diferentemente dos valores aumentados de adesão em fluxo de células vermelhas à laminina nos pacientes AF, observada em nossos experimentos utilizando os chips com microcanais com 400 μm, aqui a adesão e consequente obstrução das células vermelhas isoladas de controles e

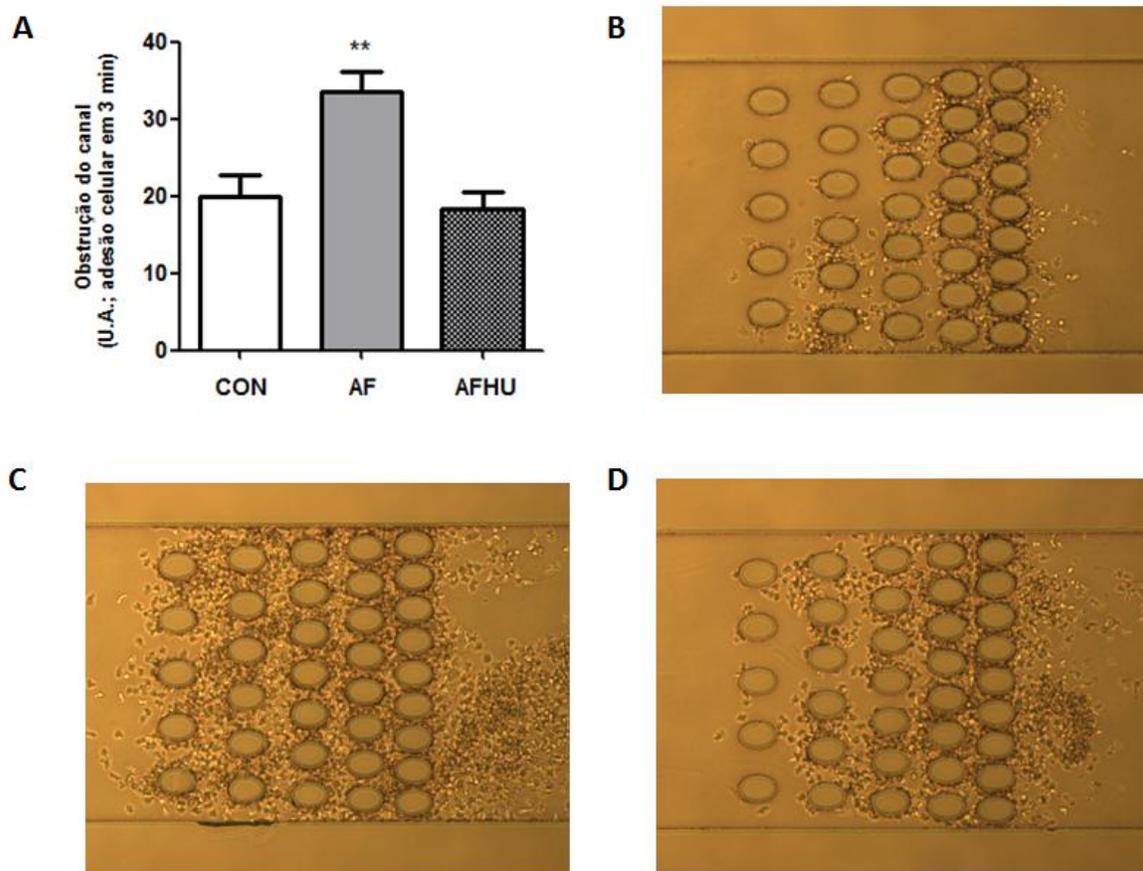
pacientes AF nos microcapilares do novo biochip foi quase nula em ambos os grupos (Figura 28).



**Figura 28.** Obstrução do microcanal do biochip (área de  $0.186 \mu\text{m}^2$ ) por eritrócitos de controles (CON, N=08) e pacientes AF (N=05) e pacientes AFHU (N=09). Hemácias ( $1 \times 10^7/\text{mL}$ ) foram perfundidas pelos canais incubados previamente com laminina ( $2 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ), a um shear stress inicial de  $0,2 \text{ d}/\text{cm}^2$ , por 3 min. A obstrução foi quantificada como U. A. (unidades arbitrárias) e calculada utilizando o software AxioVision LE64 Zeiss, de acordo com descrição em materiais e métodos.  $P > 0.05$ .

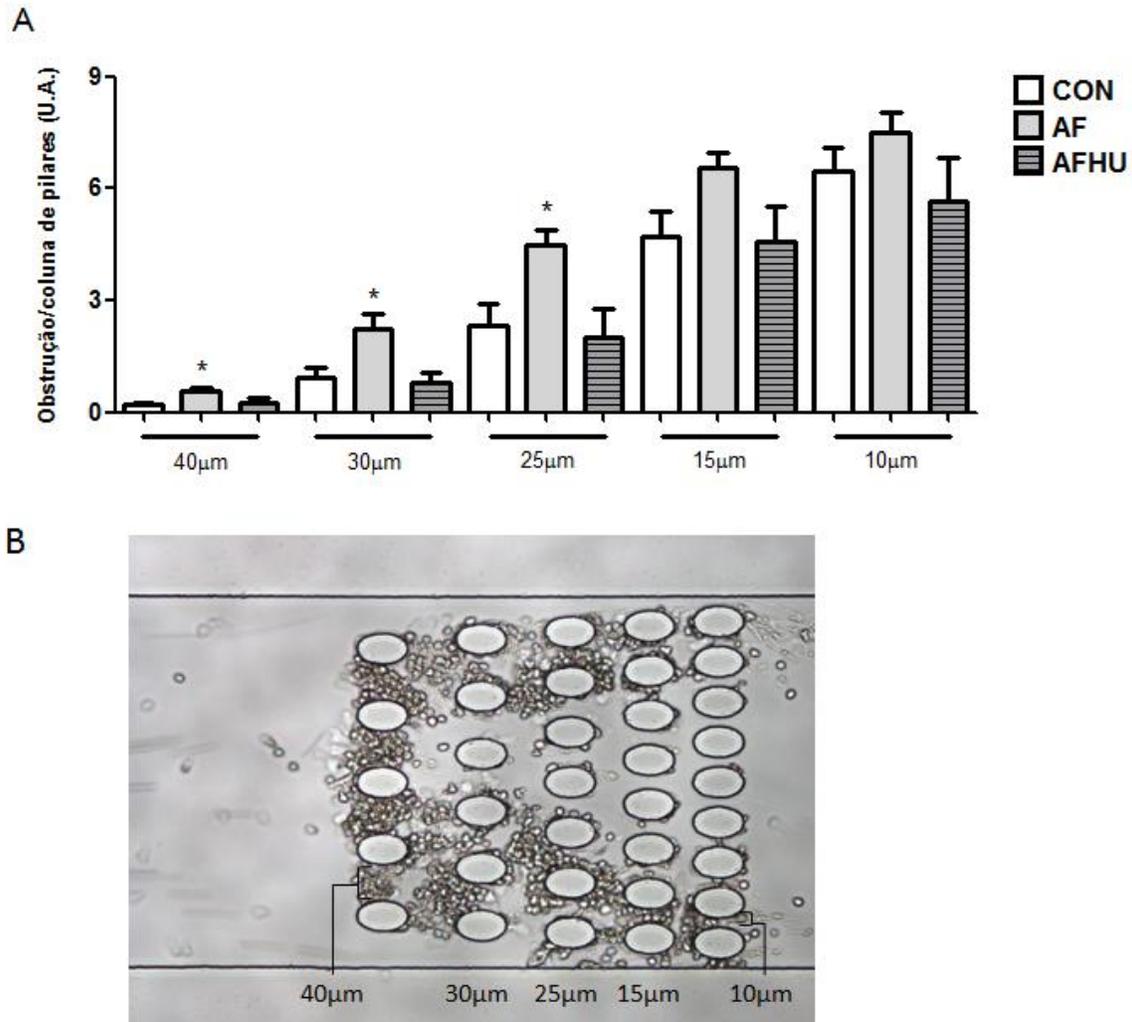
### 6.3.2 Obstrução dos microcanais do biochip com neutrófilos isolados de controles e pacientes AF

Em seguida, avaliamos a obstrução destes microcanais com neutrófilos isolados de pacientes AF e indivíduos saudáveis. Para isso, incubamos os microcanais com as principais proteínas de adesão expressas no endotélio, E-selectina ( $2 \mu\text{g}/\text{mL}$ ) e ICAM-1 ( $10 \mu\text{g}/\text{mL}$ ), e avaliamos a obstrução dos neutrófilos. Após 3 minutos de fluxo destas células nos microcanais, a um shear stress de  $0,2 \text{ d}/\text{cm}^2$ , observamos que neutrófilos isolados de pacientes AF sem a terapia com HU obstruíram significativamente mais os microcanais, comparados aos neutrófilos de controle (Figura 29).



**Figura 29.** (A) Obstrução do microcanal do biochip (área de  $0.186 \mu\text{m}^2$ ) por neutrófilos de controles (CON, N=11) e pacientes AF (N=09) e pacientes AFHU (N=06). Neutrófilos ( $5 \times 10^6/\text{mL}$ ) foram perfundidos pelos canais incubados previamente com ICAM-1 ( $10 \mu\text{g}/\text{mL}$ ) e E-selectina ( $2 \mu\text{g}/\text{mL}$ ), a um shear stress inicial de  $0,2 \text{ d}/\text{cm}^2$ , por 3 min. A obstrução foi quantificada como U. A. (unidades arbitrárias) e calculada utilizando o software AxioVision LE64 Zeiss. \*\* $P < 0.01$ , comparado ao grupo controle, de acordo com ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni; Imagens representativas da obstrução de neutrófilos após 3 minutos de fluxo de células de CON (B), AF (C) e AFHU (D). Imagens adquiridas pela câmera DeltaPix e com objetiva de magnificação de 20X.

Calculando a obstrução do microcanal, de acordo com o diâmetro criado pela disposição dos pilares em cada coluna (10, 15, 25, 30, 40  $\mu\text{m}$ ), nós encontramos que os neutrófilos de pacientes AF aderem e obstruem significativamente mais os microcanais com diâmetros de 40, 30 e 25  $\mu\text{m}$  (Figura 30 A e B), comparados aos neutrófilos de controle, que possuem obstruções observáveis somente nos microcanais com menores diâmetros, como 15 e 10  $\mu\text{m}$  (Figura 30 A).

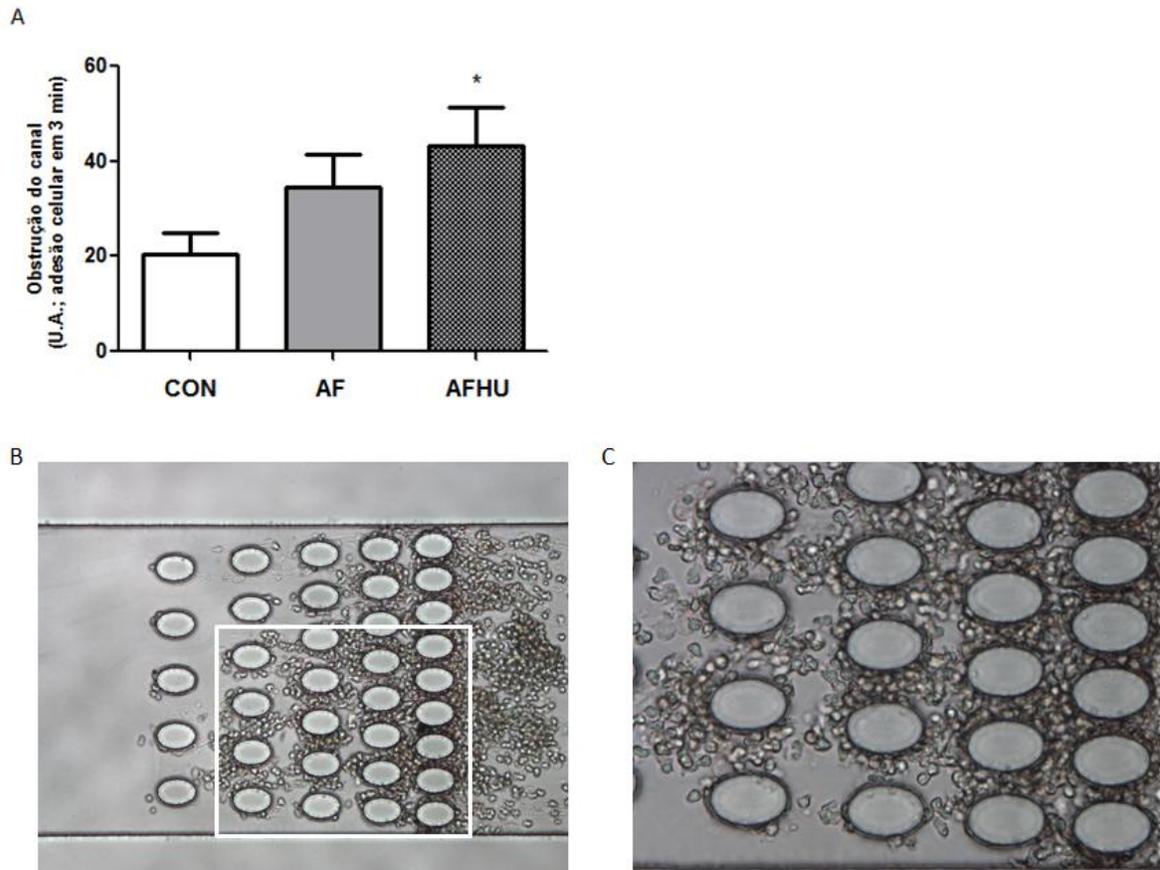


**Figura 30.** (A) Quantificação da obstrução de cada coluna de pilares de acordo com os espaços laterais entre eles (40µM - 10µM), por neutrófilos de controles (CON, N=11) e pacientes AF (N=09) e pacientes AFHU (N=06). Neutrófilos ( $5 \times 10^6/\text{mL}$ ) foram perfundidos pelos canais incubados previamente com ICAM-1 (10 µg/mL) e E-selectina (2 µg/mL), a um shear stress inicial de  $0,2 \text{ d}/\text{cm}^2$  por 3 min. A obstrução foi quantificada como U. A. (unidades arbitrárias) e calculada utilizando o software AxioVision LE64 Zeiss. \* $P < 0,05$ , comparado ao grupo controle, de acordo com ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni; (B) Imagem representativa (objetiva de 20X) da obstrução dos microcanais no momento 180 segundos por neutrófilos AF.

### 6.3.3 Avaliação da obstrução dos microcanais do biochip por neutrófilos e eritrócitos dispensados juntamente nestes canais

Tanto leucócitos, principalmente neutrófilos, quanto células vermelhas participam do processo vaso-oclusivo. Então avaliamos a obstrução dos microcanais pela suspensão de neutrófilos ( $5 \times 10^6/\text{mL}$ ) misturada à suspensão de células vermelhas autólogas ( $1 \times 10^7/\text{mL}$ ) de cada indivíduo.

A obstrução de neutrófilos/eritrócitos em microcanais previamente incubados com laminina, após 3 minutos a  $0.5 \text{d}/\text{cm}^2$ , foi significativamente maior em células provenientes de pacientes AFHU, comparada às células de controles (Figura 31) e comparada também aos níveis de obstrução observados quando foram dispensados apenas neutrófilos AF nos biochips incubados com ICAM-1 e E-selectina (Figura 29). Apesar de não ter sido significativo, observou-se uma tendência a um aumento da obstrução em células provenientes de pacientes AF sem a terapia com HU.



**Figura 31.** (A) Neutr3filos ( $5 \times 10^6$  /mL) e c3lulas vermelhas ( $1 \times 10^7$  /mL) de indiv3duos controle (CON, N=13), pacientes AF (N=09) e pacientes AFHU (N=07) foram perfundidos em microcanais previamente incubados com laminina ( $2 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) a um shear stress inicial de  $0,5 \text{ d}/\text{cm}^2$  por 3 min. Obstru3õo de cada canal foi quantificada como U. A. (unidades arbitr3rias) e calculada utilizando o software AxioVision LE64 Zeiss. \* $P < 0.05$ , comparado ao grupo controle, de acordo com teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de Dunn; (B) magnifica3õo final de 100 X e (C) 200 X.

## *7.DISSCUSSÃO*



## 7. DISCUSSÃO

### 7.1 Subprojeto 1: Avaliação das interações heterotípicas de neutrófilos aderidos pelo uso da plataforma microfluídica

A fisiopatologia da vaso-occlusão na AF envolve uma variedade de interações adesivas de células vermelhas, endotélio, leucócitos (incluindo neutrófilos, monócitos e linfócitos) e plaquetas (Telen, 2014). Um dos objetivos deste trabalho foi a padronização do uso de uma plataforma microfluídica para estudar as interações heterocelulares, que sugerimos como hipótese estarem envolvidas nas doenças inflamatórias e processos de oclusão vascular que ocorrem na microvasculatura humana. Muitos trabalhos têm utilizado modelos animais para estudar a fisiopatologia de doenças hematológicas e, atualmente, técnicas empregando câmaras de fluxo em sistemas de canais paralelos começaram a ser difundidas e utilizadas para estudos da dinâmica da adesão de células sanguíneas e cultivo de células endoteliais e isso tem levado a importantes avanços no entendimento de patologias vasculares e hematológicas. O uso de amostras de sangue de pacientes AF em nosso sistema, um modelo microfluídico *in vitro* da microcirculação humana, demonstra a utilidade clínica deste estudo.

Avaliamos as interações heterocelulares de plaquetas e neutrófilos de indivíduos controles e pacientes com AF em uso ou não da terapia com HU e não encontramos diferenças significativas quanto às interações de plaquetas e neutrófilos nestes grupos. Apesar da formação de agregados de plaqueta-monócito e plaqueta-hemácia ser bem estabelecida na literatura (Wun *et al.*, 1997, 2002), ainda existem dados conflitantes quanto a uma maior ocorrência de agregados aderentes de neutrófilo-plaqueta em pacientes com anemia falciforme (Inwald *et al.*, 2000; Wun *et al.*, 2002). É importante notar que estas interações aconteceram tanto quando foram observadas células provenientes de indivíduos saudáveis ou quando observadas células de pacientes com AF e o fato de que estas células formam interações heterocelulares sob as condições estudadas é relevante, considerando o número de leucócitos e plaquetas elevado nos indivíduos falciformes e a presença do estímulo inflamatório nos vasos (Francis e Hebbel, 1994; Steinberg e Mohandas, 1994). Podemos sugerir que a inflamação vascular e ativação do endotélio que são associadas a AF

provavelmente resultam na adesão de leucócitos à parede vascular e posteriormente à adesão secundária de plaquetas.

Nossos dados também indicam que a presença de plaquetas de pacientes AF, já aderidas aos microcanais recobertos com fibrinogênio, faz com que haja uma adesão de neutrófilos de pacientes ao canal. Esta adesão de neutrófilos na presença de outro tipo celular pode ser importante em doenças inflamatórias vasculares, como a anemia falciforme, pois neutrófilos e plaquetas quando ativados liberam mediadores inflamatórios que, por sua vez, podem aumentar a adesão e recrutamento das células circulantes sanguíneas que direcionam-se ao local de inflamação e, conseqüentemente, aumentam o processo vaso-oclusivo (Conran e Costa, 2009). Em um trabalho publicado por nosso grupo de pesquisa, Proença-Ferreira *et al.*, 2014, demonstrou que a interação de plaquetas AF com células endoteliais resulta na ativação do endotélio. Assim é possível que a liberação de mediadores inflamatórios por plaquetas aderentes pode ter conseqüências importantes, como a ativação do endotélio e de neutrófilos resultando na adesão destas células.

Avaliamos as interações de células vermelhas com neutrófilos aderidos ao ligante de fibronectina e, assim como nas interações de plaquetas com neutrófilos, não observamos diferenças significativas comparando-se os grupos de pacientes AF ao controle. Decidimos investigar a ocorrência destas interações na presença de um endotélio, representando assim, um ambiente mais semelhante ao encontrado *in vivo*. Primeiramente padronizamos a adesão de neutrófilos em fluxo às HUVECs e, no entanto, a adesão dos neutrófilos só foi observável quando da presença do estímulo de TNF- $\alpha$ . Assim, estabelecemos a concentração de TNF- $\alpha$  e o tempo de incubação nas células endoteliais e comparamos a adesão em fluxo *in vitro* de neutrófilos de controles e pacientes AF, contudo, não observamos diferenças significativas quanto aos valores de adesão.

Contrastando com nossos achados, Finnegan *et al.*, 2007, utilizando um sistema que observa a adesão de células sob fluxo, encontrou um aumento da adesão de neutrófilos AF a HUVECs estimuladas por TNF- $\alpha$ , comparado aos neutrófilos controles e pacientes AF em terapia com HU. Adicionalmente, estudos em nosso laboratório, utilizando ensaios de adesão estática de neutrófilos de controles e pacientes AF, demonstraram um aumento da adesão dos neutrófilos isolados de pacientes com AF quando utilizados os ligantes Fn ou ICAM-1 (Miguel *et al.*, 2011; Canalli *et al.*, 2008) e células endoteliais do tipo HUVECs

(Canalli *et al.*, 2011). O aumento da adesão de neutrófilos AF em condição estática e a ausência desta diferença sob condições de fluxo pode ser justificada pelo fato de que ensaios de adesão estática focam nas interações adesivas de baixa afinidade enquanto que sob condições de fluxo, ocorre a ação de receptores de alta afinidade. Assim, é possível que dentre os pacientes AF recrutados para a realização dos nossos experimentos, não haja diferença quanto à expressão ou atividade destes receptores de alta afinidade (integrinas) comparada a indivíduos sadios e desta forma, os neutrófilos não demonstrem aumento das propriedades adesivas.

Quando neutrófilos AF estavam aderidos a HUVECs, o número de interações heterocelulares com células vermelhas autólogas foi maior comparado ao dos grupos controle e pacientes AFHU. A duração destas interações não diferiu entre os grupos de pacientes AF e controle analisados. O fato do diâmetro dos canais dos biochips utilizados para cultivo de células endoteliais ser de 800  $\mu\text{m}$  (que seria maior que as vênulas de pequeno calibre  $<100\mu\text{m}$  – Doerschuk *et al.*, 1993), pode justificar estas interações breves. Possivelmente, numa área menor de circulação das células, haveria maior número de interações e contatos destas células e isto, poderia promover uma maior ativação celular e, conseqüentemente, maior tempo de interações das células. Entretanto, ao se comparar às interações neutrófilo-eritrócito em microcanais revestidos com HUVECs a quando os microcanais foram incubados com proteínas recombinantes, observamos que embora o número de interações pareça ser menor, a duração em segundos demonstrou ser maior e mais estável na presença do endotélio. Postulamos que o número maior de interações neutrófilo-hemácia observadas quando os neutrófilos foram aderidos às moléculas de adesão (todos os grupos) pode ser devido a uma concentração maior das proteínas nos microcanais, não representando a concentração real encontrada no endotélio vascular, sugerindo portanto, que os ensaios que utilizem HUVECs sejam mais fisiologicamente relevantes.

As interações neutrófilo-eritrócitos foram observadas em baixo fluxo ( $0,3\text{d}/\text{cm}^2$ ), isto demonstra a necessidade de um fluxo lento para observação destas interações. Estas condições de fluxo ocorrem principalmente na microvasculatura e especialmente quando há um grau de vaso-oclusão (Rodgers *et al.*, 1984 e Montes *et al.*, 2002), sugerindo que as

interações de neutrófilos e hemácias podem ocorrer preferencialmente em vênulas de pequeno calibre, onde o fluxo é mais lento e pode contribuir para a oclusão microvascular.

Assim como nas interações de células vermelhas com neutrófilos aderidos em HUVECs, encontramos um aumento significativo das propriedades adesivas de hemácias de pacientes AF sem uso da terapia com HU à laminina, comparadas aos grupos controle e em terapia com HU, possivelmente a terapia com HU está associada a uma redução na adesão destas células. Interessantemente, não observamos neste estudo a adesão de células vermelhas diretamente a HUVECs ou às proteínas recombinantes utilizadas. As hemácias em fluxo interagiram apenas com neutrófilos previamente aderidos, indicando que a presença e a ativação do neutrófilo sejam importantes para intermediar as interações das hemácias com o endotélio ou proteínas presentes na camada endotelial.

Apesar de não terem sido significativos os resultados obtidos com a avaliação de interação de células vermelhas a neutrófilos heterólogos, é possível inferir que os eritrócitos AF tenham um papel principal na ocorrência destas interações. Suportando este achado, não observamos diferenças quanto ao número de neutrófilos aderidos a HUVECs de controles e pacientes, também as hemácias de pacientes AF demonstraram aderir mais à laminina e resistir mais ao *shear stress* provocado pelo fluxo. Como o perfil da adesão das hemácias (CON, AF e AFHU) à laminina foi muito parecido com o perfil da adesão das hemácias aos neutrófilos, podemos sugerir que um aumento na expressão da molécula BCAM/Lu (principal receptor da hemácia para a laminina) poderia ser responsável para as interações aderentes neutrófilo-hemácia na AF, entretanto, mais experimentos utilizando inibidores de moléculas de adesão seriam necessários para comprovar este hipótese.

Nós avaliamos as interações de células vermelhas com neutrófilos aderidos a proteínas de adesão presentes no endotélio: ICAM-1 e E-selectina, a fim de verificar a participação destas proteínas na ativação neutrofílica após a adesão e subsequente interação aos eritrócitos. Neutrófilos AF aderidos à proteína ICAM-1 não demonstraram diferenças quanto ao número ou duração das interações com células vermelhas quando comparados aos neutrófilos controles. Em contrapartida, quando neutrófilos AF encontravam-se aderidos à E-selectina recombinante incubada nos microcanais do biochip, a duração destas interações foi significativamente maior nestas células quando comparada às células proveniente de controles e o uso da HU nestes pacientes pareceu reduzir a duração destas

interações. Estes dados corroboram com os achados na literatura (Hidalgo *et al.* 2009; Scheiermann *et al.*, 2010) que relatam que o sinal proveniente da E-selectina expressa no endotélio é o principal responsável pela ativação neutrofílica e subsequente interação com outras células circulantes no fluxo sanguíneo. Zennadi e colaboradores em 2008, demonstraram que a adesão de hemácias e células mononucleares ao endotélio foi inibida quando estas HUVECs foram previamente incubadas com anticorpo bloqueador da E-selectina e não com anticorpo anti-P-selectina, sugerindo que a E-selectina é a principal selectina responsável por estes processos adesivos no endotélio.

Em resumo, neutrófilos de pacientes AF aderidos a células endoteliais ativadas interagem significativamente mais com hemácias autólogas em condições de fluxo; a E-selectina parece ser a principal proteína de adesão do endotélio responsável pela ocorrência destas interações. As hemácias também parecem ter um papel essencial nas interações heterocelulares, entretanto, os neutrófilos parecem ser fundamentais para intermediar sua interação ao endotélio, pelo menos nas condições utilizadas em nosso estudo. O tratamento crônico com a HU em pacientes AF tem demonstrado efeitos benéficos quanto à ocorrência destas interações heterocelulares de neutrófilos-hemácias e adesividade destas células.

## 7.2 Subprojeto 2: Avaliação dos agregados heterocelulares circulantes de neutrófilos no sangue periférico, utilizando a tecnologia de citometria de fluxo com imagem

Os dados provenientes de modelos animais de AF indicam que a vaso-oclusão pode ser iniciada pela adesão de leucócitos ativados, especialmente neutrófilos, ao endotélio inflamado e propagada pela adesão secundária das hemácias (Turhan *et al.*, 2004; Belcher *et al.*, 2006; Belcher *et al.*, 2014). Embora o papel da adesão de leucócitos na iniciação do processo vaso-oclusivo na AF ainda não foi bem estabelecido, a associação de leucocitose com a gravidade da doença (Platt *et al.*, 1994; Tassel *et al.*, 2011) e do reconhecimento de um estado inflamatório crônico na AF (Chiang *et al.*, 2005; Hebbel, 2014; Minniti *et al.*, 2014) sugerem que tal mecanismo pode realmente existir. Há evidências de que a interação de plaquetas com outras células na microvasculatura também contribui para os processos vaso-oclusivos (Proença-Ferreira *et al.*, 2014; Telen, 2014). Uma compreensão dos processos que levam à ativação de neutrófilos e da interação dessas células com outras

células do sangue pode ajudar a identificar novos alvos terapêuticos para a prevenção da vaso-oclusão.

Neste trabalho nós fornecemos dados adicionais e inovadores demonstrando que neutrófilos de pacientes com AF tem uma maior capacidade de formar agregados heterocelulares circulantes com plaquetas e células vermelhas, em comparação aos neutrófilos de indivíduos saudáveis. A captura de glóbulos vermelhos e plaquetas por neutrófilos tem sido reportada gerar espécies reativas de oxigênio em modelos de camundongo com lesão pulmonar, levando ao dano vascular e lesão tecidual, podendo ser de relevância fisiológica na AF (Zarbock *et al.*, 2006; Hidalgo *et al.*, 2009).

A atividade das plaquetas é aumentada na AF e essas células também apresentam aumento das propriedades adesivas (Proença-Ferreira *et al.*, 2010; 2014; Wun *et al.*, 2013; Frelinger *et al.*, 2014). Em nosso estudo, verificamos que a porcentagem de neutrófilos agregados a plaquetas provenientes do sangue periférico de pacientes AF foi significativamente maior comparado a de indivíduos controles. Além disso, verificamos que a contagem de plaquetas correlacionou-se pelo teste de Spearman com a porcentagem de agregados de neutrófilos-plaqueta, apesar de não ser uma correlação forte, o resultado sugere que, adicionalmente ao aumento da ativação das plaquetas, a presença de um número maior destas células também pode promover a formação destes agregados.

A formação de agregados de leucócitos a plaquetas foi previamente relatada na AF (Wun *et al.*, 2002; Polanowska-Grabowska *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2014) e experimentos *in vivo* sugerem que a formação destes complexos pode ser reduzida através da inibição da P-selectina (Polanowska-Grabowska *et al.*, 2010). Nossos dados corroboram com esses achados e demonstram a existência destes agregados através de imagens destas células. Em adição, experimentos de bloqueio de moléculas de adesão sugerem que a integrina Mac-1 de neutrófilo e P-selectina de plaquetas medeiam a formação destes agregados de neutrófilo-plaquetas na AF e isto está de acordo com resultados de um estudo recente que demonstra a participação destas mesmas moléculas nestas interações heterotípicas de neutrófilos (Li *et al.*, 2014).

Observamos que em pacientes AF as plaquetas envolvidas nos agregados encontram-se ativadas (expressão de P-selectina) e os agregados de neutrófilo a plaquetas ativadas também estão significativamente aumentados em células obtidas destes pacientes.

Entretanto, não observamos diferenças quanto à expressão de superfície da P-selectina nas plaquetas destes agregados, sugerindo que adesão aos neutrófilos por plaquetas ativadas seja uma ocorrência esperada.

A formação de agregados de neutrófilo-células vermelhas também foi observada estar aumentada nos pacientes AF, em duas populações diferentes (brasileira e americana) e demonstradas por duas técnicas complementares de citometria de fluxo (convencional e com imagem). Estudos anteriores, utilizando sangue periférico de pacientes AF, documentaram a presença de agregados de células mononucleares a eritrócitos e a capacidade dos eritrócitos se ligarem a monócitos e neutrófilos imobilizados em placas, por ensaios de adesão de fluxo (Finnegan *et al.*, 2007; Brittain *et al.*, 2008; Chaar *et al.*, 2010). Além disso, a formação de agregados de neutrófilo-eritrócitos foi relatada *in vivo*, em modelos animais de AF (Hidalgo *et al.*, 2009). Agregados de neutrófilo-plaqueta (Polanowska-Grabowska *et al.*, 2010) e de plaqueta-células vermelhas (Wun *et al.*, 1997; 1999) já foram anteriormente descritos presentes na circulação da AF, contudo, até o presente momento, nosso trabalho descreve pela primeira vez a formação de agregados circulantes de neutrófilos-células vermelhas de células provenientes do sangue periférico de pacientes AF.

Eritrócitos imaturos, ou reticulócitos, foram o tipo dominante de células vermelhas envolvidas nestes agregados de neutrófilos. Apesar de pacientes AF apresentarem maior número de reticulócitos comparados a indivíduos sem a doença, o número de reticulócitos no sangue periférico destes pacientes não se correlacionou com a porcentagem de agregados neutrófilo-reticulócitos encontrado nestes indivíduos, o que sugere que a presença de reticulócitos em si, não seja um fator determinante para a incidência destas interações, mas talvez alterações nos reticulócitos AF, como maior expressão de moléculas de adesão, maior adesividade, podem causar o aumento destes agregados. Em contrapartida, o número de agregados de neutrófilo-células vermelhas, especialmente os agregados de neutrófilo-reticulócitos, correlacionou-se inversamente com os níveis de hemoglobina fetal (HbF), que é conhecida por inibir a polimerização da HbS. Esta diminuição na polimerização da HbS pode evitar algumas das alterações nas células vermelhas que levam à formação de agregados.

Surpreendentemente, enquanto a terapia de HU geralmente aumenta a produção de HbF (King, 2004), o uso crônico da HU dos pacientes AF em terapia não reduziu a porcentagem de agregados circulantes de neutrófilo-células vermelhas e de neutrófilo-plaquetas comparado aos pacientes AF sem o uso desta terapia medicamentosa. Esses resultados podem refletir a indicação seletiva para o tratamento com HU em pacientes com os sintomas clínicos mais graves da AF, enquanto os pacientes com sintomas mais leves muitas vezes não são tratados com HU. Alternativamente, tem sido observado em estudos recentes, que o tratamento com HU também não promove alterações significativas em alguns parâmetros relacionados a plaquetas (Novelli *et al.*, 2012; Proença-Ferreira *et al.*, 2014). Visto que a HU afetou apenas as interações de células vermelhas e neutrófilos quando da presença do endotélio nos experimentos avaliando as interações de eritrócitos com neutrófilos previamente aderidos, pois estas células estavam em suspensões isoladas e livre da presença de plaquetas, enquanto nos agregados circulantes foi observada a presença de plaquetas, o que poderia justificar a ausência de efeito protetor pela HU. Contudo, estudos longitudinais seriam necessários para determinar se o tratamento com HU não tem qualquer efeito real sobre a formação destes agregados.

A expressão de integrinas  $\beta_2$  (LFA-1 e Mac-1) e da molécula CD66b na superfície de neutrófilos agregados a células vermelhas não foi diferente entre pacientes AF e controles. Provavelmente, o maior número de agregados heterocelulares no sangue periférico de pacientes pode estar relacionado à ativação e estado conformacional destas integrinas (Hynes, 1992) e não à quantidade ou expressão destas proteínas na superfície dos neutrófilos.

A investigação das moléculas de adesão envolvidas na formação dos agregados de neutrófilo-células vermelhas através do uso de anticorpos bloqueadores de função, demonstrou uma redução da porcentagem de agregados comparada ao controle isotópico, quando houve o bloqueio das proteínas Mac-1 (CD11b) nos neutrófilos, VLA-4 (CD49d) nos reticulócitos e ICAM-4 nas hemácias, sugerindo a participação destas moléculas na adesão neutrófilo-reticulócito e neutrófilo-hemácia. Estudos anteriores, que avaliaram a adesão de células vermelhas a leucócitos em condições estáticas, sugeriram a participação das mesmas moléculas (Goel e Diamond, 2002; Zennadi *et al.*, 2008).

O anticorpo IgG1 não-específico (controle isotópico) também reduziu a porcentagem de agregados quando à porcentagem basal, no entanto, esta redução era esperada, pois trabalhos anteriores (Turhan *et al.*, 2004; Chang *et al.*, 2008; Jang *et al.*, 2012) descreveram que a administração intravenosa de IgG em camundongos falciformes reduziu o número de interações de neutrófilo e hemácias e levou a melhora do fluxo sanguíneo na microcirculação, protegendo contra os efeitos vaso-oclusivos.

Curiosamente, observamos uma correlação positiva entre a contagem de plaquetas e agregados de neutrófilo-reticulócitos no sangue periférico de pacientes AF. Com isso, investigamos um possível papel das plaquetas na formação de agregados de neutrófilo-células vermelhas. O uso do anticorpo bloqueador de função da P-selectina, nos experimentos de avaliação de agregados de neutrófilo-células vermelhas, demonstrou uma redução significativa destes agregados após o bloqueio de função das plaquetas, sugerindo este envolvimento. Além disso, a análise das imagens obtidas pelo citômetro de fluxo com imagem, através da marcação fluorescente da P-selectina, demonstrou a presença de plaquetas nestes agregados, fazendo uma ponte entre as células ou aderidas apenas ao neutrófilo que estava agregado ao eritrócito.

Quantificamos a presença de plaquetas ativadas nestas interações de neutrófilo-células vermelhas e observamos que aproximadamente metade dos agregados de neutrófilo-reticulócito possuem plaquetas envolvidas. Estes resultados são consistentes com aqueles encontrados em um estudo recente, com ensaios de adesão *in vitro*, que demonstra que os monócitos ligados a plaquetas são mais prováveis de interagir aos reticulócitos (Brittain *et al.*, 2008).

Nossos dados fornecem um mecanismo adicional de ação, em acordo com ensaios clínicos emergentes que relatam que a inibição farmacológica da P-selectina pode ser uma estratégia viável para a redução das interações heterocelulares que contribuem para o processo vaso-oclusivo na AF. Um potente agente oral bloqueador da P-selectina demonstrou, recentemente, melhorar o fluxo sanguíneo da microcirculação em pacientes com doença falciforme (Kutlar *et al.*, 2012), e uma pequena molécula intravenosa inibidora de selectina tem se mostrado promissora em reduzir a duração da crise vaso-oclusiva em um estudo de fase 2 (Telen *et al.*, 2013).

Em resumo, nossos dados sugerem um papel proeminente da plaqueta no processo de formação de agregados heterocelulares de neutrófilos na AF, em que neutrófilos AF interagem muito mais aos reticulócitos e plaquetas comparados aos neutrófilos de indivíduos saudáveis. Embora nossos dados *in vitro* não estabeleçam se esses complexos circulam em números tão altos *in vivo* ou contribuam diretamente para a vaso-oclusão, é possível inferir, com base em estudos *in vivo* utilizando camundongos falciformes (Turhan *et al.*, 2004; Hidalgo *et al.*, 2009; Polanowska-Grabowska *et al.*, 2010; Almeida *et al.*, 2012), que estes agregados podem ser formados na circulação de pacientes AF, com consequências potencialmente negativas. Dada a evidência para os efeitos destrutivos de tais agregados heterocelulares e o papel iniciador que as interações de neutrófilo-células vermelhas podem ter no processo vaso-oclusivo, abordagens para reduzir a atividade das plaquetas, bem como para reduzir a ativação da integrina Mac-1 de leucócitos na AF são fundamentais.

### 7.3 Subprojeto 3: Desenvolvimento de um biochip para estudo dos processos vaso-oclusivos utilizando a plataforma microfluídica VenaFlux

Nós desenvolvemos um novo modelo de biochip para uso em nossa plataforma microfluídica, para melhor compreensão dos processos vaso-oclusivos, este novo modelo de biochip demonstrou compatibilidade com a nossa plataforma e as taxas de fluxo (*flow rate*) foram mantidas para este novo desenho.

Pacientes com anemia falciforme apresentam vaso-oclusão nos microcapilares ocasionando danos aos tecidos e as crises dolorosas. O processo vaso-oclusivo é complexo e envolve diversos fatores, sendo alguns dos fatores contribuintes a ativação e a adesividade dos neutrófilos nestes indivíduos (Conran e Costa, 2009). Estudos prévios *in vitro*, demonstraram que tanto hemácias, quanto leucócitos de pacientes AF possuem capacidade de adesão aumentada (Zen *et al.*, 2004; Finnegan *et al.*, 2007; Brittain *et al.*, 2008; Canalli *et al.*, 2008; Zennadi *et al.*, 2008). Adicionalmente, técnicas de microscopia intravital, indicam que a adesão de neutrófilos, seguida pela adesão secundária de células vermelhas, pode iniciar o processo vaso-oclusivo em modelos de camundongos falciformes (Turhan *et al.*, 2002; 2004; Zennadi *et al.*, 2007; Chang *et al.*, 2008).

Em nosso estudo, nós não observamos obstrução de células vermelhas isoladas de pacientes AF ou indivíduos saudáveis nos microcanais incubados com laminina. Este achado corrobora com estudos prévios que demonstraram uma baixa capacidade adesiva das células vermelhas, particularmente em forças de cisalhamento elevadas encontradas nos capilares com menores calibres, como aqueles do biochip (Wagner *et al.*, 2004; Koutsiaris *et al.*, 2007, 2013).

Neutrófilos humanos podem ter diâmetros maiores que aqueles encontrados em alguns microcapilares (Doerschuk *et al.*, 1993), além disso, são menos flexíveis que os eritrócitos, o que sugere que os capilares sejam o principal sítio de obstrução mediada por leucócitos. Em nosso estudo, observamos que neutrófilos isolados de pacientes AF obstruem significativamente mais os microcanais, congruente com a literatura, que indica que neutrófilos de pacientes AF possuem uma alta adesividade e capacidade de obstruir vasos com calibres equivalentes ao da microcirculação (Fadlon *et al.*, 1998; Finnegan *et al.*, 2007; Canalli *et al.*, 2008).

Tanto neutrófilos quanto eritrócitos participam dos processos vaso-oclusivos. Nós observamos que a mistura das suspensões celulares de neutrófilos e hemácias de pacientes AF obstruíram significativamente mais os microcanais comparados aos controles ou quando foram dispensados apenas os neutrófilos AF isoladamente. Isto pode ser devido a uma interação das células vermelhas aos neutrófilos, tornando-os mais adesivos e aumentando os valores de obstrução, ou ainda, os neutrófilos por serem células maiores e menos flexíveis, ao aderirem aos microcanais, obstruem e impedem a passagem de células vermelhas, aumentando ainda mais a obstrução.

Dessa forma, nós desenvolvemos uma metodologia inovadora e reproduzível para monitorar a capacidade das células obstruírem e aderirem a microcapilares *in vitro*. Esta metodologia pode ajudar a elucidar mecanismos obstrutivos que ocorrem na microcirculação, seja na anemia falciforme ou outras desordens trombóticas, além de poder ser utilizada para melhor compreensão de mecanismos moleculares que ocorrem na microvasculatura, bem como na testagem de drogas com o potencial de inibir estas interações e, conseqüentemente, a oclusão vascular.



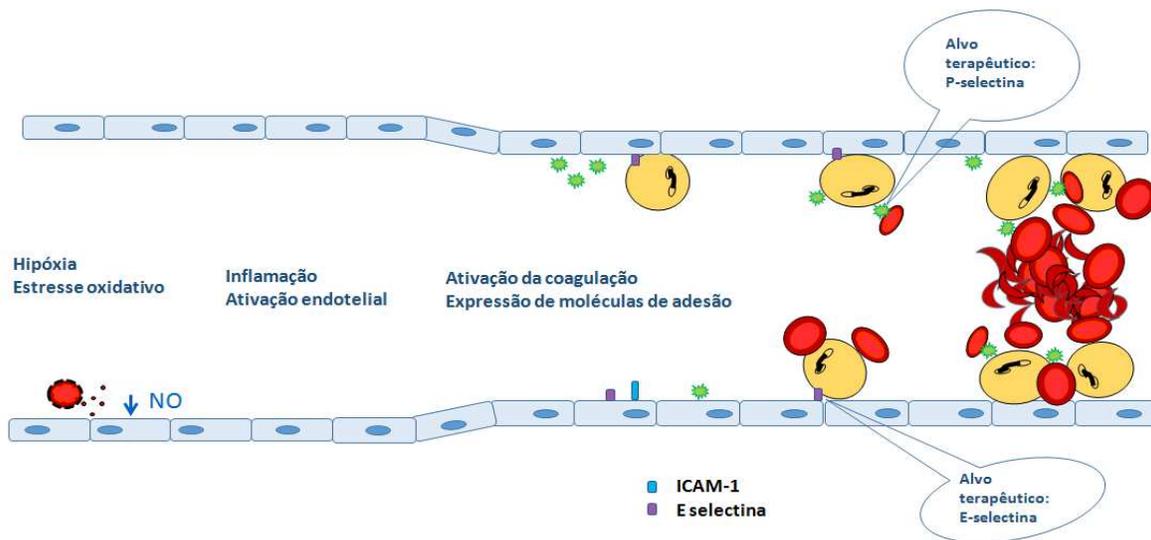
## *8. CONCLUSÕES*



## 8. CONCLUSÕES

- ❖ Utilizando os modelos experimentais desenvolvidos por nós, observamos que neutrófilos de pacientes com anemia falciforme (pacientes AF) apresentaram maior capacidade de formar interações adesivas com eritrócitos na presença ou não do endotélio, comparados com neutrófilos de indivíduos saudáveis;
- ❖ Além disso, neutrófilos e hemácias obtidos de pacientes com anemia falciforme demonstraram maior capacidade de obstrução de microcanais com 25-40 $\mu$ m de diâmetro *in vitro*;
- ❖ Em nosso modelo experimental, células provenientes de pacientes AF em terapia com HU demonstraram redução do número de interações de células vermelhas a neutrófilos aderidos;
- ❖ Nossos dados indicam que a molécula endotelial E-selectina parece ser a principal molécula responsável pela ocorrência das interações aderentes de neutrófilo-células vermelhas no endotélio;
- ❖ As moléculas Mac-1 (neutrófilo) e P-selectina (plaqueta) contribuem para a formação de agregados circulantes heterocelulares de neutrófilos, podendo representar alvos terapêuticos;
- ❖ Não foram observadas grandes alterações na incidência da formação de agregados heterocelulares de neutrófilos-plaquetas (aderentes ao endotélio e circulantes) em amostras de sangue periférico provenientes de pacientes AF e de indivíduos saudáveis. No entanto, sob nossas condições experimentais, as plaquetas demonstraram um papel importante na formação de agregados circulantes de neutrófilos-células vermelhas em sangue periférico proveniente de pacientes AF;
- ❖ Desenvolvemos uma nova metodologia eficaz para estudo dos mecanismos de oclusão da microvasculatura *in vitro*, esta tecnologia pode ser aplicada para desordens

trombóticas com quadro inflamatório vascular crônico, como ocorre na anemia falciforme e investigação de agentes terapêuticos para a melhora do quadro inflamatório.



**Figura 32. Principais observações das interações heterocelulares de neutrófilos na Anemia Falciforme, observadas em nossa metodologia.** A adesão de leucócitos à parede dos vasos, promovida pela expressão das moléculas de adesão no endotélio vascular, faz com que os neutrófilos aderidos fiquem em uma posição estratégica que facilita a interação a outras células circulantes sanguíneas, como hemácias ou plaquetas. Além disso, os neutrófilos também podem circular agregados a estas células dentro dos vasos. Os neutrófilos de pacientes com AF possuem maior capacidade de obstrução de microcanais *in vitro*, na presença ou não de células vermelhas e todas essas interações podem acarretar no processo vaso-oclusivo encontrado na AF. Em nosso modelo experimental *in vitro*, observamos que a molécula E-selectina, expressa na superfície do endotélio, possa ser a proteína responsável pela ativação de neutrófilos aderidos e consequente interação destas células aos eritrócitos. Vimos que a molécula P-selectina, expressa em plaquetas, foi importante nas interações não aderentes de neutrófilos com plaquetas e células vermelhas e o bloqueio desta molécula reduziu a formação destes agregados heterocelulares de neutrófilos na AF, constituindo-se em um importante alvo terapêutico para redução das crises vaso-oclusivas nos pacientes com esta patologia.

## *REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Almeida CB, Scheiermann C, Jang J, Prophete C, Costa FF, Conran N, Frenette PS. Hydroxyurea and a cGMP-amplifying agent have immediate benefits on acute vaso-occlusive events in sickle cell disease mice. *Blood* 2012; 120 (14):2879-88.

Alon R, Feigelson S. From rolling to arrest on blood vessels: leukocyte tap dancing on endothelial integrin ligands and chemokines at sub-second contacts. *Seminars in Immunology* 2002; 14:93-104.

Assis A, Conran N, Canalli AA, Lorand-Metze I, Saad ST, Costa FF. Effect of cytokines and chemokines on sickle neutrophil adhesion to fibronectin. *Acta Haematol* 2005; 113:130-6.

Baetta R, Corsini A. Role of polymorphonuclear neutrophils in atherosclerosis: Current state and future perspectives. *Atherosclerosis* 2010; 210:1-13.

Bailly P, Tontti E, Hermand P, Cartron JP, Gahmberg CG. The red cell LW blood group protein is an intercellular adhesion molecule which binds to CD11/CD18 leukocyte integrins. *Eur J Immunol* 1995; 25:3316-20.

Balkaran B, Char G, Morris JS, Thomas PW, Serjeant BE, Serjeant GR. Stroke in a cohort of patients with homozygous sickle cell disease. *J Pediatr* 1992; 120:360-6.

Bartolucci P, Chaar V, Picot J, Bachir D, Habibi A, Fauroux C et al. Decreased sickle red blood cell adhesion to laminin by hydroxyurea is associated with inhibition of Lu/BCAM protein phosphorylation. *Blood* 2010; 116:2152-9.

Belcher JD, Marker PH, Weber JP, Hebbel RP, Vercellotti GM. Activated monocytes in sickle cell disease: potential role in the activation of vascular endothelium and vasoocclusion. *Blood* 2000; 96:2451-9.

Belcher JD, Mahaseth H, Welch TE, Vilback AE, Sonbol KM, Kalambur VS, Bowlin PR, Bischof JC, Hebbel RP, Vercellotti GM. Critical role of endothelial cell activation in hypoxia-induced vasoocclusion in transgenic sickle mice. *Am J of Physiol* 2005; 288:H2715-25.

Belcher JD, Mahaseth H, Welch TE, Otterbein LE, Hebbel RP, Vercellotti GM. Heme oxygenase-1 is a modulator of inflammation and vaso-occlusion in transgenic sickle mice. *J Clin Invest* 2006; 116(3):808-16.

Belcher JD, Chen C, Nguyen J, Milbauer L, Abdulla F, Alayash AI et al. Heme triggers TLR4 signaling leading to endothelial cell activation and vaso-occlusion in murine sickle cell disease. *Blood* 2014; 123(3):377-90.

Boggs DR, Hyde F, Srodes C. An unusual pattern of neutrophil kinetics in sickle cell anemia. *Blood* 1973; 41:59-65.

Brittain JE, Parise LV. The alpha4beta1 integrin in sickle cell disease. *Transfusion clinique et biologique: Journal de la Societe francaise de transfusion sanguine* 2008; 15(1-2):19-22.

Brittenham GM, Schechter AN, Noguchi CT. Hemoglobin S polymerization: primary determinant of the hemolytic and clinical severity of the sickling syndromes. *Blood* 1985; 65: 183-9.

Canalli AA, Franco-Penteado CF, Saad ST, Conran N, Costa FF. Increased adhesive properties of neutrophils in sickle cell disease may be reversed by pharmacological nitric oxide donation. *Haematologica* 2008; 93: 605-9.

Canalli AA, Proença RF, Franco-Penteado CF, Traina F, Sakamoto TM, Saad ST et al. Participation of Mac-1, LFA-1 and VLA-4 integrins in the in vitro adhesion of sickle cell disease neutrophils to endothelial layers, and reversal of adhesion by simvastatin. *Haematologica* 2011; 96:526-33.

Cascão R, Rosário HS, Souto-Carneiro MM, Fonseca JE. Neutrophils in rheumatoid arthritis: More than simple final effectors. *Autoimmunity Reviews* 2010; 9(8): 531-5.

Castro O, Brambilla DJ, Thorington B, Reindorf CA, Scott RB, Gillette P et al. The acute chest syndrome in sickle cell disease: Incidence and risk factors. *Blood* 1994; 84:643-9.

Chaar V, Picot J, Renaud O, Bartolucci P, Nzouakou R, Bachir D et al. Aggregation of mononuclear and red blood cells through  $\alpha_4\beta_1$ -Lu/BCAM interaction in sickle cell disease. *Haematologica* 2010; 95:1841-8.

Chang J, Shi PA, Chiang EY, Frenette PS. Intravenous immunoglobulins reverse acute vaso-occlusive crises in sickle cell mice through rapid inhibition of neutrophil adhesion. *Blood* 2008; 111: 915-23.

Charache S, Terrin ML, Moore RD, Dover GJ, Barton FB, Eckert SV et al. Effect of hydroxyurea on frequency of painful crises in sickle cell anemia. *N Engl J Med* 1995; 332: 1317-22.

Chen G1, Zhang D, Fuchs TA, Wagner DD, Frenette PS. Heme-induced neutrophil extracellular traps contribute to the pathogenesis of sickle cell disease. *Blood* 2014; [epub ahead of print]

Chiang EY, Frenette PS. Sickle cell vaso-occlusion. *Hematology/oncology clinics of North America*. 2005; 19(5):771-84.

Clark SR, Ma AC, Tavener B, McDonald Z, Goodarzi M, Kelly K et al. Platelet TLR4 activates neutrophil extracellular traps to ensnare bacteria in septic blood. *Nat Med* 2007; 13(4):463-9.

Colella MP, De Paula EV, Conran N, Machado-Neto JA, Annicchino-Bizzacchi JM, Costa FF et al. Hydroxyurea is associated with reductions in hypercoagulability markers in sickle cell anemia. *J Thromb Haemost* 2012; 10(9):1967-70.

Conran N, Costa FF. Hemoglobin disorders and endothelial cell interactions. *Clinical Biochemistry* 2009; 42 (18):1824-38.

Conran N, Franco-Penteado CF, Costa FF. Newer aspects of the pathophysiology of sickle cell disease vaso-occlusion. *Hemoglobin* 2009; 33(1): 1-16.

Costa FF, Conran N, Fertrin KY. Anemia Falciforme; Marco Antônio Zago, Roberto Passeto Falcão, Ricardo Pasquini. *Tratado de Hematologia*, São Paulo: Editora Atheneu, 2013.

Cotran RS, Kumar V, Collins T. Robbins Patologia Estrutural e Funcional; tradução João Lobato do Santos e Wilhermo Torres. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 2000.

Covas DT1, de Lucena Angulo I, Vianna Bonini Palma P, Zago MA. Effects of hydroxyurea on the membrane of erythrocytes and platelets in sickle cell anemia. *Haematologica*. 2004; 89(3):273-80.

Doerschuk CM, Beyers N, Coxson HO, Wiggs B, Hogg JC. Comparison of neutrophil and capillary diameters and their relation to neutrophil sequestration in the lung. *Journal of applied physiology* 1993; 74:3040-5.

Duits AJ, Pieters RC, Saleh AW, van Rosmalen E, Katerberg H, Berend K, Rojer RA. Enhanced levels of soluble VCAM-1 in sickle cell patients and their specific increment during vasoocclusive crisis. *Clin Immunol Immunopathol* 1996; 81:96-8.

Fadlon E, Vordermeier S, Pearson TC, Mire-Sluis AR, Dumonde DC, Phillips J et al. Blood polymorphonuclear leukocytes from the majority of sickle cell patients in the crisis phase of the disease show enhanced adhesion to vascular endothelium and increased expression of CD64. *Blood* 1998; 91:266-74.

Finnegan ME, Turhan A, Golan DE, Barabino GA. Adherent leukocytes capture sickle erythrocytes in an in vitro flow model of vaso-occlusion. *American Journal of Hematology* 2007; 82: 266-75.

Francis RBJr, Hebbel RP. Hemostasis. In: *Sickle Cell Disease: Basic Principles and Clinical Practice* (SH Embury, RP Hebbel, MH Steinberg, and N Mohandas, Eds.) New York: Raven 1994; 299-310.

Frelinger AL, 3rd, Jakubowski JA, Brooks JK, Carmichael SL, Berny-Lang MA, Barnard MR et al. Platelet Activation and Inhibition in Sickle cell disease (PAINS) study. *Platelets*. 2014; 25(1):27-35.

Frenette PS. Sickle cell vaso-occlusion: multistep and multicellular paradigm. *Curr Opin Hematol* 2002; 9:101-6.

Furman MI, Benoit SE, Barnard MR, Valeri CR, Borbone ML, Becker RC et al. Increased platelet reactivity and circulating monocyte-platelet aggregates in patients with stable coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol* 1998; 31:352-8.

Gambero S, Canalli AA, Traina F, Albuquerque DM, Saad ST, Costa FF et al. Therapy with hydroxyurea is associated with reduced adhesion molecule gene and protein expression in sickle red cells with a concomitant reduction in adhesive properties. *Eur J Haematol* 2007; 78:144-51.

Garrido VT, Proença-Ferreira R, Dominical VM, Traina F, Bezerra MA, de Mello MR et al. Elevated plasma levels and platelet-associated expression of the pro-thrombotic and pro-inflammatory protein, TNFSF14 (LIGHT), in sickle cell disease. *Br J Haematol*. 2012; 158(6):788-97.

Gawaz M, Fateh-Moghadam S, Pilz G, Gurland HJ, Werdan K. Platelet activation and interaction with leucocytes in patients with sepsis or multiple organ failure. *Eur J Clin Invest* 1995; 25:843-51.

Gawaz M, Neumann FJ, Ott I, Schiessler A, Schömig A. Platelet function in acute myocardial infarction treated with direct angioplasty. *Circulation* 1996; 93(2):229-37.

Goel M and Diamond S. Adhesion of normal erythrocytes at depressed venous shear rates to activated neutrophils, activated platelets, and fibrin polymerized from plasma. *Blood* 2002; 100: 3797-803.

Hagar W, Vichinsk E. Advances in clinical research in sickle cell disease. *British Journal of Haematology* 2008; 141:346–56.

Hebbel RP, Yamada O, Moldow CF, Jacob HS, White JG, Eaton JW. Abnormal adherence of sickle erythrocytes to cultured vascular endothelium: possible mechanism for microvascular occlusion in sickle cell disease. *J Clin Invest* 1980; 65(1):154-60.

Hebbel RP, Osarogiagbon R, Kaul D. The endothelial biology of sickle cell disease: inflammation and a chronic vasculopathy. *Microcirculation* 2004; 11(2):129-51.

Hebbel RP. Ischemia-reperfusion Injury in Sickle Cell Anemia: Relationship to Acute Chest Syndrome, Endothelial Dysfunction, Arterial Vasculopathy, and Inflammatory Pain. *Hematology/oncology clinics of North America*. 2014; 28(2):181-98.

Hernand P, Huet M, Callebaut I, Gane P, Ihanus E, Gahmberg CG et al. Binding sites of leukocyte beta 2 integrins (LFA-1, Mac-1) on the human ICAM-4/LW blood group protein. *J Biol chem* 2000; 275: 2602-10.

Hidalgo A, Peired AJ, Wild MK, Vestweber D, Frenette PS. Complete identification of E-selectin ligands on neutrophils reveals distinct functions of PSGL-1, ESL-1, and CD44. *Immunity* 2007; 26: 477-89.

Hidalgo A, Chang J, Jang JE, Peired AJ, Chiang EY, Frenette PS. Heterotypic interactions enabled by polarized neutrophil microdomains mediate thromboinflammatory injury. *Nature Medicine* 2009; 15(4): 384-91.

Hilden TJ, Nurmi SM, Fagerholm SC, Gahmberg G. Interfering with leukocyte integrin activation – a novel concept in the development of anti-inflammatory drugs. *Annals of Medicine* 2006; 38: 503-11.

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

Inwald DP, Kirkham FJ, Peters MJ, Lane R, Wade A, Evans JP et al. Platelet and leucocyte activation in childhood sickle cell disease: association with nocturnal hypoxaemia. *Br J Haematol* 2000; 111:474–81.

Issekutz AC. Adhesion molecules mediating neutrophil migration to arthritis in vivo and across endothelium and connective tissue barriers in vitro. *Inflammation research* 1998; 47 Supl 3: 123-32.

Jakubowski JA, Zhou C, Jurcevic S, Winters KJ, Lachno DR, Frelinger AL et al. A phase 1 study of prasugrel in patients with sickle cell disease: effects on biomarkers of platelet activation and coagulation. *Thrombosis research*. 2014; 133(2):190-5.

Jang JE, Hidalgo A, Frenette PS. Intravenous immunoglobulins modulate neutrophil activation and vascular injury through FcγRIII and SHP-1. *Circulation research*. 2012 Apr 13;110(8):1057-66.

Kalambur V, Mahaseth H, Bischof J, Kielbik MC, Welch TE, Vilback A et al. Microvascular blood flow and stasis in transgenic sickle mice: Utility of a dorsal skin fold chamber for intravital microscopy. *Am J Hematol* 2004; 77:117–25.

Kaneider CN, Egger P, Dunzendorfer S, Wiedermann CJ. Rho-GTPase-dependent platelet-neutrophil interaction affected by HMG-CoA reductase inhibition with altered adenosine nucleotide release and function. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002; 22: 1029-35.

Kato GJ, Hebbel RP, Steinberg MH, Gladwin MT. Vasculopathy in sickle cell disease: Biology, pathophysiology, genetics, translational medicine, and new research directions. *Am J Hematol*. 2009;84:618-25.

Kaul DK, Hebbel RP. Hypoxia/reoxygenation causes inflammatory response in transgenic sickle mice but not in normal mice. *J Clin Invest* 2000; 106:411–20.

Kaul DK, Liu X-D, Choong S, Belcher JD, Vercellotti GM, Hebbel RP. Anti-inflammatory therapy ameliorates leukocyte adhesion and microvascular flow abnormalities in transgenic sickle mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2004; 287:H293–301.

King SB. Nitric oxide production from hydroxyurea. *Free radical biology & medicine* 2004; 15;37(6):737-44.

Kinney TR, Sleeper LA, Wang WC, Zimmerman RA, Pegelow CH, Ohene-Frempong K et al. Silent cerebral infarcts in sickle cell anemia: a risk factor analysis. *The Cooperative Study of Sickle Cell Disease*. *Pediatrics* 1999; 103:640–45.

Kirschenbaum LA, Adler D, Astiz ME, Barua RS, Saha D, Rackow EC. Mechanisms of platelet-neutrophil interactions and effects on cell filtration in septic shock. *Shock* 2002; 17:508-12.

Kogaki S, Sawa Y, Sano T, Matsushita T, Ohata T, Kurotobi S et al. Selectin on activated platelets enhances neutrophil endothelial adherence in myocardial reperfusion injury. *Cardiovasc Res* 1999; 43:968-73.

Konstantopoulos K, Neelamegham S, Burns AR, Hentzen E, Kansas GS, Snapp KR et al. Venous levels of shear support neutrophil-platelet adhesion and neutrophil aggregation in blood via P-selectin and beta2-integrin. *Circulation* 1998; 98(9):873-82.

Koutsiaris AG, Tachmitzi SV, Batis N, et al. Volume flow and wall shear stress quantification in the human conjunctival capillaries and post-capillary venules in vivo. *Biorheology* 2007; 44:375-86.

Koutsiaris AG, Tachmitzi SV, Batis N. Wall shear stress quantification in the human conjunctival pre-capillary arterioles in vivo. *Microvascular research* 2013; 85:34-9.

- Kutlar A, Ataga KI, McMahon L, Howard J, Galacteros F, Hagar W, et al. A potent oral P-selectin blocking agent improves microcirculatory blood flow and a marker of endothelial cell injury in patients with sickle cell disease. *American journal of hematology* 2012; 87(5):536-9.
- Lanaro C, Franco-Penteado CF, Albuquerque DM, Saad ST, Conran N, Costa FF. (2009) Altered levels of cytokines and inflammatory mediators in plasma and leukocytes of sickle cell anemia patients and effects of hydroxyurea therapy. *J Leukoc Biol* 2009; 85: 235-42.
- Lanzkron S, Strouse JJ, Wilson R, Beach MC, Haywood C, Park H et al. Systematic review: hydroxyurea for the treatment of adults with sickle cell disease. *Ann Intern Med* 2008; 48: 939–55.
- Lard LR, Mul FP, de Haas M, Roos D, Duits AJ. Neutrophil activation in sickle cell disease. *J Leukoc Biol* 1999; 66:411–5.
- Ley K, Tedder TF. Leukocyte interactions with vascular endothelium: New insights into selectin-mediated attachment and rolling. *Journal of Immunology* 1995; 155:525-8.
- Ley K, Laudanna C, Cybulsky MI, Nourshargh S. Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nature reviews/Immunology* 2007; 7:678-89.
- Li J, Kim K, Hahm E, Molokie R, Hay N, Gordeuk VR, et al. Neutrophil AKT2 regulates heterotypic cell-cell interactions during vascular inflammation. *J Clin Invest* 2014; 124(4):1483-96.
- Long A, Mitchell S, Kashanin D, Williams V, Prina-Mello A, Shvets I et al. A Multidisciplinary approach to the Study of T cell migration. *Annals of New York Academy of Sciences* 2004; 1028: 313-9.
- Lorenowicz MJ, Fernandez-Borja M, Hordijk PL. cAMP signaling in leukocyte transendothelial migration. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology* 2007; 27:1014-22.
- Lou TF, Singh M, Mackie A, Li W, Pace BS. Hydroxyurea generates nitric oxide in human erythroid cells: mechanisms for gamma-globin gene activation. *Exp Biol Med* 2009; 234: 1374–82.
- Maier-Redelsperger M, Labie D, Elion J. Long-term hydroxyurea treatment in young sickle cell patients. *Curr Opin Hematol* 1999; 6:115-20.
- Makó V, Czúcz J, Weiszhar Z, Herczenik E, Matkó J, Prohászka Z, Cervenak L. Proinflammatory activation pattern of human umbilical vein endothelial cells induced by IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , and LPS. *Cytometry A* 2010; 77(10):962-70.
- Manwani D, Frenette PS. Vaso-occlusion in sickle cell disease: pathophysiology and novel targeted therapies. *Hematology / the Education Program of the American Society of Hematology American Society of Hematology Education Program* 2013;362-9.
- May AE, Langer H, Seizer P, Bigalke B, Lindemann S, Gawaz M. Platelet-leukocyte interactions in inflammation and atherothrombosis. *Seminars in thrombosis and hemostasis* 2007; 33(2):123-7.
- McDonald B1, Urrutia R, Yipp BG, Jenne CN, Kubes P. Cell Intravascular neutrophil extracellular traps capture bacteria from the bloodstream during sepsis. *Host Microbe* 2012; 12(3):324-33.

Miguel LI, Dominical VM, Almeida CB, Saad STO, Costa FF, Conran N. Inhibition of Phosphodiesterase 9A Reduces Cytokine-Stimulated in vitro Adhesion of Neutrophils from Sickle Cell Anemia Individuals. *Inflamm Res* 2011; 60(7):633-42.

Minniti CP, Delaney KM, Gorbach AM, Xu D, Lee CC, Malik N, et al. Vasculopathy, inflammation, and blood flow in leg ulcers of patients with sickle cell anemia. *American journal of hematology* 2014; 89(1):1-6.

Montes RA, Eckman JR, Hsu LL, Wick TM. Sickle erythrocyte adherence to endothelium at low shear: role of shear stress in propagation of vaso-occlusion. *Am J Hematol* 2002; 70:216–27.

Nacher M, Hidalgo A. Fire within the vessels: interactions between blood cells and inflammatory vascular injury. *Frontiers in bioscience* 2011; 3:1089-100.

Nagel RL, Fabry ME, Steinberg MH. The paradox of hemoglobin SC disease. *Blood Reviews* 2003; 17:167-78.

Nash GB. Adhesion between neutrophils and platelets: a modulator of thrombotic and inflammatory events? *Thrombosis research* 1994;74 Suppl 1:S3-11.

Nishimura S, Manabe I, Nagasaki M, Seo K, Yamashita H, Hosoya Y et al. In vivo imaging in mice reveals local cell dynamics and inflammation in obese adipose tissue. *J Clin Invest* 2008; 118, 710-21.

Noguchi CT, Rodgers GP, Serjeant G, Schechter AN. Levels of fetal hemoglobin necessary for treatment of sickle cell disease. *N Engl J Med* 1988; 318: 96–9.

Novelli EM, Kato GJ, Ragni MV, Zhang Y, Hildesheim ME, Nouraie M, et al. Plasma thrombospondin-1 is increased during acute sickle cell vaso-occlusive events and associated with acute chest syndrome, hydroxyurea therapy, and lower hemolytic rates. *Am J Hematol* 2012; 87(3):326-30.

Odièvre MH, Brun M, Krishnamoorthy R, Lapoumériou C, Elion J. Sodium Phenyl Butyrate downregulates endothelin-1 expression in cultured human endothelial cells: Relevance to Sickle-cell disease. *Am J Hematol* 2007; 82: 357-62.

Ohene-Frempong K, Weiner SJ, Sleeper LA, Miller ST, Embury S, Moohr JW et al. Cerebrovascular accidents in sickle cell disease: rates and risk factors. *Blood* 1998; 91:288–94.

Ott I, Neumann FJ, Gawaz M, Schmitt M, Schomig A. Increased neutrophil-platelet adhesion in patients with unstable angina. *Circulation* 1996; 94:1239-46.

Polanowska-Grabowska R, Wallace K, Field JJ, Chen L, Marshall MA, Figler R et al. P-selectin-mediated platelet-neutrophil aggregate formation activates neutrophils in mouse and human sickle cell disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2010; 30: 2392-99.

Platt OS, Brambilla DJ, Rosse WF, Milner PF, Castro O, Steinberg MH et al. Mortality in sickle cell disease: life expectancy and risk factors for early death. *N Engl J Med* 1994; 330:1639–44.

Proenca-Ferreira R, Franco-Penteado CF, Traina F, Saad ST, Costa FF, Conran N. Increased adhesive properties of platelets in sickle cell disease: roles for alphaIIb beta3-mediated ligand binding, diminished cAMP signalling and increased phosphodiesterase 3A activity. *Br J Haematol* 2010; 149(2):280-8.

Proenca-Ferreira R, Brugnerotto AF, Garrido VT, Dominical VM, Vital DM, Ribeiro M de F et al. Endothelial activation by platelets from sickle cell anemia patients. *PloS One* 2014; 9(2):e89012.

Rees DC, Williams TN, Gladwin MT. Sickle-cell disease. *Lancet* 2010; 376: 2018–31.

Rodgers GP, Schechter AN, Noguchi CT, Klein HG, Nienhuis AW, Bonner RF. Periodic microcirculatory flow in patients with sickle-cell disease. *N Eng J Med* 1984; 311:1534–8.

Rogers, Z.R. Hydroxyurea therapy for diverse pediatric populations with sickle cell disease. *Semin Hematol* 1997; 34:42-7.

Romero Z, Urbinati F, Geiger S, Cooper AR, Wherley J, Kaufman ML et al.  $\beta$ -globin gene transfer to human bone marrow for sickle cell disease. *J Clin Invest* 2013; 1. pii: 67930. doi: 10.1172/JCI67930. [Epub ahead of print]

Ruf A, Schlenk RF, Maras A, Morgenstern E, Patscheke H. Contact-induced neutrophil activation by platelets in human cell suspensions and whole blood. *Blood* 1992; 80:1238-46.

Shenoy S. Hematopoietic stem cell transplantation for sickle cell disease: current practice and emerging trends. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2011; 2011:273–9.

Scheiermann AC, Kunisaki Y, Jang JE, Frenette PS. Neutrophil microdomains: linking heterocellular interactions with vascular injury. *Current opinion in hematology* 2010; 17:25-30.

Schmidt T, Zündorf J, Grüger T, Brandenburg K, Reiners AL, Zinserling J et al. CD66b overexpression and homotypic aggregation of human peripheral blood neutrophils after activation by a grampositive stimulus. *Leukoc Biol* 2012; 91:791–802.

Steinberg MH, Mohandas N. Laboratory values. In: *Sickle Cell Disease: Basic Principles and Clinical Practice* (SH Embury, RP Hebbel, N Mohandas, and MH Steinberg, Eds.) New York:Raven 1994; 469–484.

Stuart, M.J.; Nagel, R.L. Sickle-cell disease. *Lancet* 2004; 364:1343-60.

Tassel C, Arnaud C, Kulpa M, Fleurence E, Kandem A, Madhi F, et al. Leukocytosis is a risk factor for lung function deterioration in children with sickle cell disease. *Respiratory medicine* 2011; 105(5):788-95.

Tarrant TK, Patel DD. Chemokines and leukocyte trafficking in rheumatoid arthritis. *Pathophysiology* 2006; 13: 1-14.

Telen MJ, Wun T, McCavit TL, De Castro LM, Krishnamurti L, Lanzkron S, et al. GMI 1070: Reduction In Time To Resolution Of Vaso-Occlusive Crisis and Decreased Opioid Use In a Prospective, Randomized, Multi-Center Double Blind, Adaptive Phase 2 Study In Sickle Cell Disease *Blood* 2013;122(21):Abstract 776

Telen MJ. Cellular Adhesion and the Endothelium: E-Selectin, L-Selectin, and Pan-Selectin Inhibitors. *Hematology/oncology clinics of North America* 2014; 28(2):341-54.

Toetsch S, Olwell P, Prina-Mello A, Volkov Y. The evolution of chemotaxis assays from static models to physiologically relevant platforms. *Integrative Biology* 2009; 1:170-81.

Turhan A, Weiss LA, Mohandas N, Collier BS, Frenette PS. Primary role for adherent leukocytes in sickle cell vascular occlusion: a new paradigm. *Proc Nat Acad Sci USA* 2002; 99:3047-51.

Turhan A, Jenab P, Bruhns P, Ravetch JV, Collier BS, Frenette PS. Intravenous immune globulin prevents venular vaso-occlusion in sickle cell mice by inhibiting leukocyte adhesion and the interactions between sickle erythrocytes and adherent leukocytes. *Blood* 2004; 103:2397-400.

Van der Meer AD, Poot AA, Duits MHG, Feijen J, Vermes I. Microfluidic Technology in Vascular Research. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 2009; 8231-48.

Von Hundelshausen P, Koenen RR, Weber C. Platelet-mediated enhancement of leukocyte adhesion. *Microcirculation* 2009; 16:84-96.

Wagner MC, Eckman JR, Wick TM. Sickle cell adhesion depends on hemodynamics and endothelial activation. *The Journal of laboratory and clinical medicine* 2004; 144:260-7; discussion 227-68.

Ware RE. Hydroxycarbamide: clinical aspects. *Comptes rendus biologiques* 2013; 336(3):177-82.

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

Wun T, Paglieroni T, Field CL, Welborn J, Cheung A, Walker NJ, et al. Platelet-erythrocyte adhesion in sickle cell disease. *Journal of investigative medicine : the official publication of the American Federation for Clinical Research* 1999; 47(3):121-7.

Wun T, Cordoba M, Rangaswami A, Cheung AW, Paglieroni T. Activated monocytes and platelet-monocyte aggregates in patients with sickle cell disease. *Clin Lab Haematol* 2002; 24:81-8.

Wun T, Soulieres D, Frelinger AL, Krishnamurti L, Novelli EM, Kutlar A, et al. A double-blind, randomized, multicenter phase 2 study of prasugrel versus placebo in adult patients with sickle cell disease. *Journal of hematology & oncology* 2013; 6:17.

Yang J, Furie BC, Furie B. The biology of P-selectin glycoprotein ligand-1: its role as a selectin counterreceptor in leukocyte-endothelial and leukocyte-platelet interaction. *Thromb Haemost* 1999; 81:1-7.

Zarbock A, Singbartl K, Ley K. Complete reversal of acid-induced acute lung injury by blocking of platelet-neutrophil aggregation. *The Journal of clinical investigation* 2006; 116(12):3211-9.

Zarbock A, Polanowska-Grabowska RK, Ley K. Platelet-neutrophil-interactions: linking hemostasis and inflammation. *Blood* 2007; 21(2): 99-111.

Zen Q, Batchvarova M, Twyman CA, et al. B-CAM/LU expression and the role of B-CAM/LU activation in binding of low- and high-density red cells to laminin in sickle cell disease. *American journal of hematology* 2004; 75:63-72.

Zennadi R, Moeller BJ, Whalen EJ, Batchvarova M, Xu K, Shan S et al. Epinephrine-induced activation of LW-mediated sickle cell adhesion and vaso-occlusion in vivo. *Blood*. 2007; 110:2708-17.

Zennadi R, De Castro L, Eyler C, Xu K, Ko M, Telen MJ. Role and regulation of sickle red cell interactions with other cells: ICAM-4 and other adhesion receptors. *Transfusion Clinique et Biologique* 2008; 15:23-8.

*ANEXOS*



## ANEXO I - Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa da FCM/UNICAMP



FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS  
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

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

CEP, 23/11/10  
(Grupo III)

**PARECER CEP:** N° 1005/2010 (Este n° deve ser citado nas correspondências referente a este projeto).  
**CAAE:** 0783.0.146.000-10

### I - IDENTIFICAÇÃO:

**PROJETO: “AVALIAÇÃO DE INTERAÇÕES HETEROTÍPICAS DE NEUTRÓFILOS EM CONDIÇÕES INFLAMATÓRIAS”.**

**PESQUISADOR RESPONSÁVEL:** Venine Marcela Dominical

**INSTITUIÇÃO:** Hemocentro/UNICAMP

**APRESENTAÇÃO AO CEP:** 13/10/2010

**APRESENTAR RELATÓRIO EM:** 23/11/11 (O formulário encontra-se no *site* acima).

### II - OBJETIVOS

Avaliar as interações heterotípicas de neutrófilos com hemácias e neutrófilos com plaquetas sob condições inflamatórias, investigando as moléculas de adesão e as vias de sinalização intracelulares envolvidos, através de ensaio de adesão celular em fluxo *in vitro* e comparar estas interações heterotípicas de neutrófilos a um modelo da doença inflamatória crônica.

### III - SUMÁRIO

Trata-se de um projeto para devesa de tese de doutorado. Serão coletados sangue de voluntários, e posteriormente sangue de indivíduos com anemia falciforme, com idade entre 18 e 50 anos, de ambos os sexos. Serão avaliados células obtidas do sangue de indivíduos adultos saudáveis e realizar ensaios de adesão em fluxo a células endoteliais humanos provenientes de cultura celular. Na primeira fase do projeto, serão recrutados 40 indivíduos saudáveis (alunos, funcionários e doadores de sangue do Hemocentro) para realização dos experimentos. Serão excluídos indivíduos que tenham feito ou façam uso de medicação antiinflamatórias/analgésicas. Na segunda fase será feita uma comparação de resultados encontrados nas amostras de sangue de 10 indivíduos homozigotos para anemia falciforme. A anemia falciforme será diagnosticada pela técnica de eletroforese, através de separação das hemoglobinas e estes indivíduos não deverão apresentar nenhuma condição não-associada à sua doença. Serão excluídos os pacientes que apresentarem quadros de crises de dor nos últimos três meses e que tenham recebido transfusão durante o mesmo período. Os pacientes não deverão estar em uso de terapia com hidroxureia, nem ter usado medicamentos com efeitos anti-inflamatórios durante os 15 dias anteriores. As amostras de sangue serão coletadas e passarão por separação de hemácias, separação de neutrotrófilos, separação das plaquetas, cultivo de células epiteliais. Os pesquisadores pretendem, com os resultados deste projeto pretende promover o desenvolvimento de novos alvos terapêuticos anti-inflamatórios e/ou anti-trombóticos e beneficiar algumas condições inflamatórias crônicas, como a anemia falciforme.

### IV - COMENTÁRIOS DOS RELATORES

---

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

FONE (019) 3521-8936  
FAX (019) 3521-7187  
cep@fcm.unicamp.br

- 1 -



Após respostas às pendências, o projeto encontra-se adequadamente redigido e de acordo com a Resolução CNS/MS 196/96 e suas complementares, bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

#### V - PARECER DO CEP

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

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

#### VI - INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES

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

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

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

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

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

#### VII- DATA DA REUNIÃO

Homologado na X Reunião Ordinária do CEP/FCM, em 26 de outubro de 2010.

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

## *APÊNDICE*



**APÊNDICE** – Artigo submetido em 7 de abril de 2014.

**Letter to the Editor**

**Prominent role of platelets in the formation of circulating neutrophil-red cell heterocellular aggregates in sickle cell anemia**

Venina M. Dominical<sup>1</sup>, Leigh Samsel<sup>2</sup>, James S. Nichols<sup>3</sup>, Fernando F. Costa<sup>1</sup>, J. Phillip McCoy Jr.<sup>2</sup>, Nicola Conran<sup>1\*</sup>, Gregory J. Kato<sup>3\*</sup>

\*Joint corresponding authors

<sup>1</sup>INCT de Sangue, Hematology and Hemotherapy Center, University of Campinas - UNICAMP, Campinas, SP, Brazil

<sup>2</sup>Flow Cytometry Core and <sup>3</sup>Sickle Cell Vascular Disease Section, Hematology Branch, National Heart, Lung, and Blood Institute, National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA

Nicola Conran, Ph.D.  
Centro de Hematologia e Hemoterapia,  
Faculdade de Ciências Médicas,  
Rua Carlos Chagas, 480 - Cidade Universitária,  
Barão Geraldo, Campinas 13083-970-SP, Brazil.  
Email: conran@unicamp.br  
Phone: +55 19 3521 8533

Gregory J. Kato, MD  
Department of Medicine, Division of Hematology-Oncology  
and the Heart, Lung and Blood Vascular Medicine Institute  
University of Pittsburgh  
200 Lothrop Street, BST E1240  
Pittsburgh, PA 15261  
Email: katogj@upmc.edu  
Office Phone: 412-648-3017  
Office Fax: 412-648-5980

Main text word count: 1444

Tables/Figures: 3

1 High leukocyte counts are often observed in sickle cell anemia (SCA) and are  
2 associated with increased clinical severity. *In vivo* animal model studies indicate that  
3 the adhesion of leukocytes, particularly neutrophils, to the vessel wall may promote  
4 subsequent secondary red blood cell (RBC) recruitment, in turn triggering the initiation  
5 of the vaso-occlusive process.<sup>1-3</sup> While circulating neutrophil-platelet aggregates are  
6 well documented in inflammatory conditions such as sepsis, atherosclerosis and  
7 SCA,<sup>4-6</sup> where they are thought to augment tissue injury,<sup>1,6</sup> the formation of leukocyte-  
8 RBC aggregates in humans is not well studied. The existence of circulating RBC-  
9 mononuclear cell aggregates has been reported in sickle cell disease (SCD), while the  
10 capture of SCD RBC by adherent leukocytes has been observed *in vitro*.<sup>7-9</sup> However,  
11 the existence circulating neutrophil-RBC aggregates has, to our knowledge, yet to be  
12 described in humans, even in inflammatory settings.

13 A total of 28 SCA patients in steady state, in use of HU (SCAHU; 15-30  
14 mg/kg/day) or not, were recruited to the study (see Supplementary Table 1). Healthy  
15 controls (HbAA) were age- and gender-matched, where possible. This study was  
16 approved by the Ethics Committee of the National Heart, Lung, and Blood Institute,  
17 NIH, in accordance with the Declaration of Helsinki; all subjects provided their informed  
18 consent ([clinicalstudies.info.nih.gov](http://clinicalstudies.info.nih.gov) identifier 03-H-0015). Multispectral imaging flow  
19 cytometry (Amnis® ImageStreamX MKII; Amnis Corporation, Seattle, WA) was  
20 employed to observe neutrophil aggregates in peripheral blood samples. For this,  
21 granulocytes were isolated from samples by Ficoll sedimentation and neutrophil-RBC  
22 aggregates were labelled for cytometry (anti-CD11a-APC, anti-CD11b-APC-Cy7, anti-  
23 CD66b-V450, anti-CD71 FITC, anti-CD235a PE, and respective isotype controls; BD  
24 Biosciences, San Jose, CA and Caltag Invitrogen, Camarillo, CA). CD66b-positive

25 neutrophils were acquired as single cells and aggregates (~6 000 events); images (40X  
26 objective) were taken and data were analyzed using IDEAS 6.0 software.

27 We found that the formation of neutrophil-RBC (CD66b<sup>+</sup>/CD235a<sup>+</sup>) aggregates  
28 was significantly augmented in SCA patients (Figure 1A and C), compared to healthy  
29 individuals. As the percentage of neutrophils aggregated to RBC did not differ  
30 significantly between the SCA ( $10.3 \pm 1.5\%$ ;  $n = 9$ ) and SCAHU ( $12.4 \pm 2.3\%$ ;  $n = 14$ ;  
31  $P > 0.05$ ) groups, SCA data were grouped together (SCA and SCAHU) for subsequent  
32 analyses. To our knowledge, whilst circulating platelet-RBC and mononuclear cell-  
33 RBC aggregates<sup>8,10</sup> have been previously described in SCD, this is the first description  
34 of the formation of circulating neutrophil-RBC aggregates in human SCA.

35 Immature RBCs, or reticulocytes (CD235a<sup>+</sup>CD71<sup>+</sup>), rather than mature RBCs  
36 (CD235a<sup>+</sup>CD71<sup>-</sup>) were the dominant type of RBC involved in SCA neutrophil-RBC  
37 aggregates (Figure 1B and C). Although reticulocyte counts are quite high in SCA  
38 (Supplementary Table 1), reticulocyte numbers in these patients did not correlate with  
39 the percentage of neutrophil-reticulocyte aggregates (Figure 1D), suggesting that the  
40 presence of reticulocytosis per se is not a determining factor for neutrophil-reticulocyte  
41 aggregate formation in SCA, rather alterations in these reticulocytes may cause these  
42 interactions. In contrast, the number of neutrophil-RBC aggregates, especially  
43 neutrophil-reticulocyte aggregates, correlated inversely with the level of fetal  
44 hemoglobin (HbF) (Figure 1D), which is known to inhibit polymerization of HbS. This  
45 decrease in HbS polymerization may prevent some of the alterations in RBC that lead  
46 to aggregate formation.

47 The leukocyte surface expressions of the adhesion molecule components  
48 CD11a (Mac-1 integrin subunit) and CD11b (LFA-1 integrin subunit) and the CD66b  
49 activation marker were verified on SCA and control individual neutrophil-RBC

50 aggregates (representative images shown in Figure 2A); however, no significant  
51 differences in the surface expressions of these molecules were observed on the  
52 neutrophils of the control and SCA groups (data not shown). In contrast, function-  
53 inhibiting antibody experiments indicated a participation of the neutrophil Mac-1  
54 integrin in neutrophil-RBC aggregates (Figure 2B and 2C). Integrins can exist in low-  
55 and high-affinity states<sup>11</sup> and, based on our data, it is probable that changes in integrin  
56 affinity, or avidity, rather than expression are responsible for the increased  
57 heterocellular leukocyte aggregates observed in SCA. Function-blocking assays also  
58 indicated the participation of the VLA-4 integrin on reticulocytes (CD235a<sup>+</sup>CD71<sup>+</sup>,  
59 Figure 2B) and of ICAM-4 expressed on mature RBCs (CD235a<sup>+</sup>CD71<sup>-</sup>, Figure 2C) in  
60 SCA neutrophil-RBC aggregate formation, in agreement with previous studies  
61 investigating leukocyte interactions.<sup>1</sup> A non-specific IgG1 antibody also reduced the  
62 incidence of aggregates, albeit to a lesser degree, compared to baseline, consistent  
63 with reports that intravenous IgG administration in sickle mice reduces neutrophil and  
64 erythrocyte interactions and improves microcirculatory blood flow.<sup>2</sup>

65 Intriguingly, we observed a positive correlation between platelet counts and  
66 neutrophil-reticulocyte aggregates in SCA (Figure 1F) and, thus, we investigated a  
67 possible role for platelets in aggregate formation. Figure 3A-C demonstrates that the  
68 incubation of SCA granulocyte suspensions with a P-selectin-blocking antibody  
69 significantly reduced the number of total neutrophil-RBC aggregates, as well as  
70 neutrophil-reticulocyte aggregates. Furthermore, analysis by flow cytometry of  
71 fluorescently-labelled SCA neutrophil-RBC aggregates that had been concomitantly  
72 labelled with anti-CD62P demonstrated that activated platelets participated in the  
73 formation of approximately 20% of total neutrophil-RBC aggregates (Figure 3D) and  
74 50% of neutrophil-reticulocyte aggregates (Figure 3E), while 20% of all neutrophil-

75 mature RBC aggregates were CD62P-positive (Figure 3F), indicating the formation of  
76 ternary complexes. The corresponding images of these aggregates demonstrated a  
77 prominent role of platelets in these heterocellular complexes, apparently forming a  
78 bridge between the neutrophil and the erythrocyte/reticulocyte in the majority of  
79 aggregates (Figure 3G). In other images, platelets were observed adhered just to  
80 neutrophils, which, in turn formed heterocellular interactions with RBCs, consistent with  
81 a previous *in vitro* report demonstrating that platelet bound monocytes are more likely  
82 to interact with reticulocytes.<sup>7</sup>

83 It was somewhat surprising that, while fetal hemoglobin levels correlated  
84 negatively with neutrophil-RBC aggregate formation in SCA, no significant alteration in  
85 the incidence of neutrophil-RBC aggregates was found in the blood of SCA patients  
86 on therapy with HU, compared to SCA patients not on HU. Additional experiments  
87 carried out in another population of steady-state SCA patients in Brazil demonstrated  
88 a similar lack of difference in neutrophil-RBC aggregate formation in aged-matched  
89 patients on and off HU therapy (data not shown). These results might reflect  
90 confounding by indication, whereby patients with the most severe clinical symptoms of  
91 SCA are selectively prescribed HU therapy, while those patients with milder symptoms  
92 are often not treated with HU. Alternatively, a lack of significant alterations with HU  
93 treatment in some platelet-related parameters has been observed in some recent  
94 studies.<sup>12,13</sup> Importantly data provided in Supplementary Table 1 indicate that, in our  
95 study population, the platelet counts of the patients that were on HU were not  
96 significantly different to those of patients not on HU. Given the prominent role that  
97 platelets appear to play in the formation of these aggregates it may be that the number  
98 of platelets and neutrophils and their activation state may be more crucial to the  
99 formation of neutrophil-RBC aggregates in the circulation than red cell fetal hemoglobin

100 content Longitudinal studies would be required to determine whether HU therapy has  
101 no real effect on the formation of these aggregates.

102 In summary, we report a significant capacity for neutrophils to form  
103 heterocellular aggregates with red cells, particularly reticulocytes, in the circulation of  
104 SCA individuals; furthermore, a key role for platelets in the formation of these  
105 aggregates is suggested. Although our *in vitro* data do not establish whether these  
106 complexes circulate in such high numbers *in vivo* or contribute directly to vaso-  
107 occlusion, it is feasible to conclude, based on *in vivo* data from sickle mouse  
108 models,<sup>1,3,6</sup> that these aggregates may be formed in the circulation of SCA individuals.  
109 Given the evidence for the significant destructive effects of such heterocellular  
110 aggregates and the initiating role that RBC-neutrophil interactions may have in the  
111 vaso-occlusive process, we suggest that the formation of these heterocellular  
112 aggregates may contribute to vascular inflammation and occlusion with potentially  
113 damaging consequences. Thus, approaches to reduce the activity of platelets, such as  
114 the potent oral P-selectin-blocking agent and small molecule selectin inhibitor<sup>14,15</sup> that  
115 are currently undergoing clinical trials, as well as to reduce leukocyte Mac-1 integrin  
116 activation, could be valuable resources for reducing heterocellular interactions.

117

118

#### 119 **Acknowledgments**

120 The authors thank Laurel Mendelsohn for assistance with laboratory techniques and  
121 Dr. Kleber Fertrin for assistance with data analysis. The authors also thank the patients  
122 who provided blood samples for this study. This study was funded by grants from the  
123 Fundação de Amparo a Pesquisa de Sao Paulo –Brazil (FAPESP, grants 2012/21702-

124 0, 2010/18388-4 and 10/17320-0), CNPq-Brazil and the National Heart, Lung and  
125 Blood Institute Division of Intramural Research (1 ZIA HL006013-03).

126

## 127 Authorships and Disclosures

128 NC and GJK were the principal investigators and take primary responsibility for the  
129 paper; VMD, NC and GJK designed the study; VMD performed the laboratory work  
130 for the study; GJK and JSN recruited patients; LS and JPM supervised imaging flow  
131 cytometry work; VMD, FFC, GJK and NC analyzed data and wrote the paper. The  
132 authors have no potential conflicts of interest relevant to this study to declare.

133

134

## 135 REFERENCES

- 136 1. Hidalgo A, Chang J, Jang JE, Peired AJ, Chiang EY, Frenette PS. Heterotypic interactions  
137 enabled by polarized neutrophil microdomains mediate thromboinflammatory injury. *Nat*  
138 *medicine*. 2009;15(4):384-91.
- 139 2. Turhan A, Jenab P, Bruhns P, Ravetch JV, Collier BS, Frenette PS. Intravenous immune globulin  
140 prevents venular vaso-occlusion in sickle cell mice by inhibiting leukocyte adhesion and the  
141 interactions between sickle erythrocytes and adherent leukocytes. *Blood*. 2004;103(6):2397-  
142 400.
- 143 3. Turhan A, Weiss LA, Mohandas N, Collier BS, Frenette PS. Primary role for adherent  
144 leukocytes in sickle cell vascular occlusion: a new paradigm. *Proc Natl Acad Sci USA*.  
145 2002;99(5):3047-51.
- 146 4. May AE, Langer H, Seizer P, Bigalke B, Lindemann S, Gawaz M. Platelet-leukocyte interactions  
147 in inflammation and atherothrombosis. *Semin Thromb Hemost*. 2007;33(2):123-7.
- 148 5. Gawaz M, Fatah-Moghadam S, Pütz G, Gurland HJ, Wenzel K. Platelet activation and  
149 interaction with leukocytes in patients with sepsis or multiple organ failure. *Eur J Clin Invest*.  
150 1995;25(11):843-51.
- 151 6. Polanowska-Grabowska R, Wallace K, Field JJ, Chen L, Marshall MA, Figler R, et al. P-selectin-  
152 mediated platelet-neutrophil aggregate formation activates neutrophils in mouse and human  
153 sickle cell disease. *Art Thromb Vascular Biol*. 2010;30(12):2392-9.
- 154 7. Brittain JE, Knoll CM, Ataga KI, Orringer EP, Parise LV. Fibronectin bridges monocytes and  
155 reticulocytes via integrin alpha4beta1. *Br J Haematol*. 2008;141(5):872-81.
- 156 8. Chear V, Picot J, Renaud O, Bartolucci P, Nzoussou R, Bachir O, et al. Aggregation of  
157 mononuclear and red blood cells through an [alpha]4[beta]1-Lu/basal cell adhesion molecule  
158 interaction in sickle cell disease. *Haematologica*. 2010;95(11):1841-8.
- 159 9. Finnegan EM, Turhan A, Golan DE, Sarabino GA. Adherent leukocytes capture sickle  
160 erythrocytes in an in vitro flow model of vaso-occlusion. *Am J Hematol*. 2007;82(4):266-75.

6

- 161 10. Wun T, Paglieroni T, Tablin F, Welborn J, Nelson K, Cheung A. Platelet activation and platelet-  
162 erythrocyte aggregates in patients with sickle cell anemia. *J Lab Clin Med.* 1997;129(3):307-  
163 16.
- 164 11. Hynes RO. Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell.*  
165 1992;69(1):11-25.
- 166 12. Novelli EM, Kato GJ, Ragni MV, Zhang Y, Hildesheim ME, Noursie M, et al. Plasma  
167 thrombospondin-1 is increased during acute sickle cell vaso-occlusive events and associated  
168 with acute chest syndrome, hydroxyurea therapy, and lower hemolytic rates. *Am J Hematol.*  
169 2012;87(3):326-30.
- 170 13. Proenca-Ferreira R, Brugnerotto AF, Garrido VT, Dominical VM, Vital DM, Ribeiro Mde F, et  
171 al. Endothelial activation by platelets from sickle cell anemia patients. *PLoS one.*  
172 2014;9(2):e89012.
- 173 14. Kutler A, Ataga KI, McMahon L, Howard J, Galacteros F, Hagar W, et al. A potent oral P-  
174 selectin blocking agent improves microcirculatory blood flow and a marker of endothelial cell  
175 injury in patients with sickle cell disease. *Am J Hematol.* 2012;87(5):536-9.
- 176 15. Telen MJ, Wun T, McCavit TL, De Castro LM, Krishnamurti L, Lanzkron S, et al. GMI 1070:  
177 Reduction in Time To Resolution Of Vaso-Occlusive Crisis and Decreased Opioid Use in a  
178 Prospective, Randomized, Multi-Center Double Blind, Adaptive Phase 2 Study in Sickle Cell  
179 Disease. *Blood.* 2013;122(21):Abstract 776

180

181

182

183

184

185

186 **Supplementary Table 1. Clinical details of patients participating in the study (USA**  
 187 **population).**

	SCA	SCAHU
<b>Male/Female</b>	3/5	8/14
<b>Age (years)</b>	29.7 (33, 21, 34)	47.4 (50.5, 27, 62)
<b>Red Blood Cell Count (10<sup>12</sup>/L)</b>	2.9 (2.8, 2.2, 3.7)	2.26 (2.1, 1.7, 3.1)
<b>Hematocrit (%)</b>	24.4 (23.7, 18.6, 23.6)	24.3 (24.8, 19.5, 30.1)
<b>Hemoglobin (g/L)</b>	8.4 (8.1, 6.8, 9.8)	8.5 (8.5, 6.5, 10.9)
<b>Mean Corpuscular Volume (fl)</b>	84.8 (84.2, 74.1, 97.7)	108.6 (111, 78, 133.2)
<b>Reticulocytes (%)</b>	14.1 ( 11.6, 6.5, 22)	7.2 (6, 3.5, 13.7)
<b>White Blood Cell Count (10<sup>9</sup>/L)</b>	9.5 (9.7, 7.8, 11)	6.4 (5.9, 3.1, 12.7)
<b>Platelet Count (10<sup>9</sup>/L)</b>	353 (359, 125, 530)	411.3 (314.5, 104, 1750)
<b>HbF (%)</b>	7.9 (7.5, 2.2, 13.7)	18.15 (19.9, 2.9, 29.9)

188 Except for sex, all data represent the mean (median, minimum, maximum) values for steady-  
 189 state sickle cell anemia (SCA), SCA patients on HU therapy (SCAHU; 15–30 mg/kg/d). HbF,  
 190 fetal hemoglobin.  
 191

192 **Figure 1. Circulating neutrophil-RBC heterocellular aggregates are augmented in SCA**  
193 **patients. (A)** Percentage of neutrophils (CD66b+) aggregated to red blood cells (RBCs) in the  
194 peripheral blood of healthy individuals (Control, n=11) and SCA patients on/off HU (SCA,  
195 n=23), as detected by imaging flow cytometry. \*\*p<0.01, compared to control group (Mann-  
196 Whitney test). (B) Percentage of neutrophils (CD66b+) aggregated to immature  
197 (CD235a<sup>+</sup>/CD71<sup>+</sup>) and mature (CD235a<sup>+</sup>/CD71<sup>-</sup>) RBCs in the peripheral blood of healthy  
198 individuals (Control, n=11) and SCA patients on/off HU (SCA, n=23), as detected by imaging  
199 flow cytometry; \*\*\*p<0.001, compared to respective control group (Mann-Whitney test); (C)  
200 Representative brightfield (BF) and fluorescent images, acquired by imaging flow cytometry;  
201 CD66b<sup>+</sup> neutrophils (purple color) aggregated to immature RBCs (CD235a<sup>+</sup> - yellow color;  
202 CD71<sup>+</sup> - green color) or mature RBCs (CD235a<sup>+</sup> - yellow color; CD71<sup>-</sup>); Final image: merged  
203 CD66b<sup>+</sup>/CD235a<sup>+</sup>/CD71<sup>+</sup>. Cells are from representative samples of peripheral blood from  
204 control, SCA and SCAHU patients. (D) Correlation of reticulocyte counts, (E) HbF levels and  
205 (F) platelet counts with percentages of neutrophil-reticulocyte aggregates (CD235a<sup>+</sup>/CD71<sup>+</sup>) in  
206 SCA (on/off HU) patients (n=17); Spearman's non-parametric correlation test.  
207

208 **Figure 2. Inhibition of Mac-1, VLA-4 and ICAM-4 function reverses the formation of**  
209 **neutrophil-RBC heterocellular aggregates. (A)** Representative brightfield (BF) and  
210 fluorescent images, acquired by imaging flow cytometry, of CD66b<sup>+</sup> neutrophils (purple color)  
211 expressing CD11a (LFA-1 subunit) and CD11b (Mac-1 subunit) and aggregated to immature  
212 RBCs (CD235a<sup>+</sup> - yellow color; CD71<sup>+</sup> - green color) or mature RBCs (CD235a<sup>+</sup> - yellow color;  
213 CD71<sup>-</sup>); Final image: merged CD66b<sup>+</sup>/CD235a<sup>+</sup>/CD71<sup>+</sup>. Aggregates from the peripheral blood  
214 of control, SCA and SCAHU patients. Effects of the incubation of granulocyte suspensions (12  
215 min, 37°C) with a non-specific antibody (IgG1), or adhesion-molecule blocking  
216 antibodies/peptides against the CD11a (LFA-1), CD11b (Mac-1), CD49d (VLA-4), ICAM-4 and  
217 BCAM molecules, on the percentage of neutrophils aggregated to (B) immature RBCs  
218 (CD235<sup>+</sup>CD71<sup>+</sup>) and (C) mature RBCs (CD235<sup>+</sup>CD71<sup>-</sup>) in samples from SCA patients (n=13).  
219 Anti-CD11a [clone 38; 10µg/mL] and anti-CD11b [clone ICRF44; 10µg/mL] were from AbD

220 Serotec, Raleigh, NC; anti-CD49d [clone 2B4, 10µg/mL], and anti-ICAM [25µg/mL] were from  
221 R&D Biosystems, Minneapolis, MN; ICAM-4 blocking peptide (SC-27685, 200µg/mL) was  
222 from Santa Cruz Biotech, Santa Cruz, CA. Non-specific IgG1 (10µg/mL) was from R&D  
223 Biosystems. \*p<0.05, \*\*p<0.01 (Friedman/Dunn's), compared to non-specific IgG1 antibody.  
224

225 **Figure 3. Involvement of platelets in SCA neutrophil-RBC interactions.** Percentages of  
226 neutrophils from steady-state SCA (on/off HU) individuals aggregated to (A) RBCs (CD235a<sup>+</sup>),  
227 (B) reticulocytes (CD235a<sup>+</sup>/CD71<sup>+</sup>) and (C) mature RBCs (CD235a<sup>+</sup>/CD71<sup>-</sup>) under basal  
228 conditions and after incubation of granulocyte suspension with a non-specific IgG antibody or  
229 P-selectin function-blocking antibody (Anti-CD62P; clone 9E1, 2µg/mL) (n=7); \*p<0.05,  
230 \*\*p<0.01, compared to basal (Friedman/Dunn's). Percentages of neutrophils aggregated to (D)  
231 RBCs (CD235a<sup>+</sup>), (E) reticulocytes (CD235a<sup>+</sup>/CD71<sup>+</sup>) and (F) mature RBCs (CD235a<sup>+</sup>/CD71<sup>-</sup>)  
232 ), and demonstrating the presence (+) or not (-) of activated (P-selectin-positive) platelets in  
233 these aggregates when analyzed by flow cytometry (SCA on/off HU; n= 7). (G) Representative  
234 images of the involvement of platelets (CD62P<sup>+</sup>; red color) in the aggregates of neutrophils  
235 (CD66b<sup>+</sup>; purple color) with RBC (CD235a<sup>+</sup>; yellow color) expressing, or not, the transferrin  
236 receptor (CD71<sup>+</sup>; green color). BF=brightfield mode and respective channels of fluorescence.

237  
238  
239  
240  
241  
242

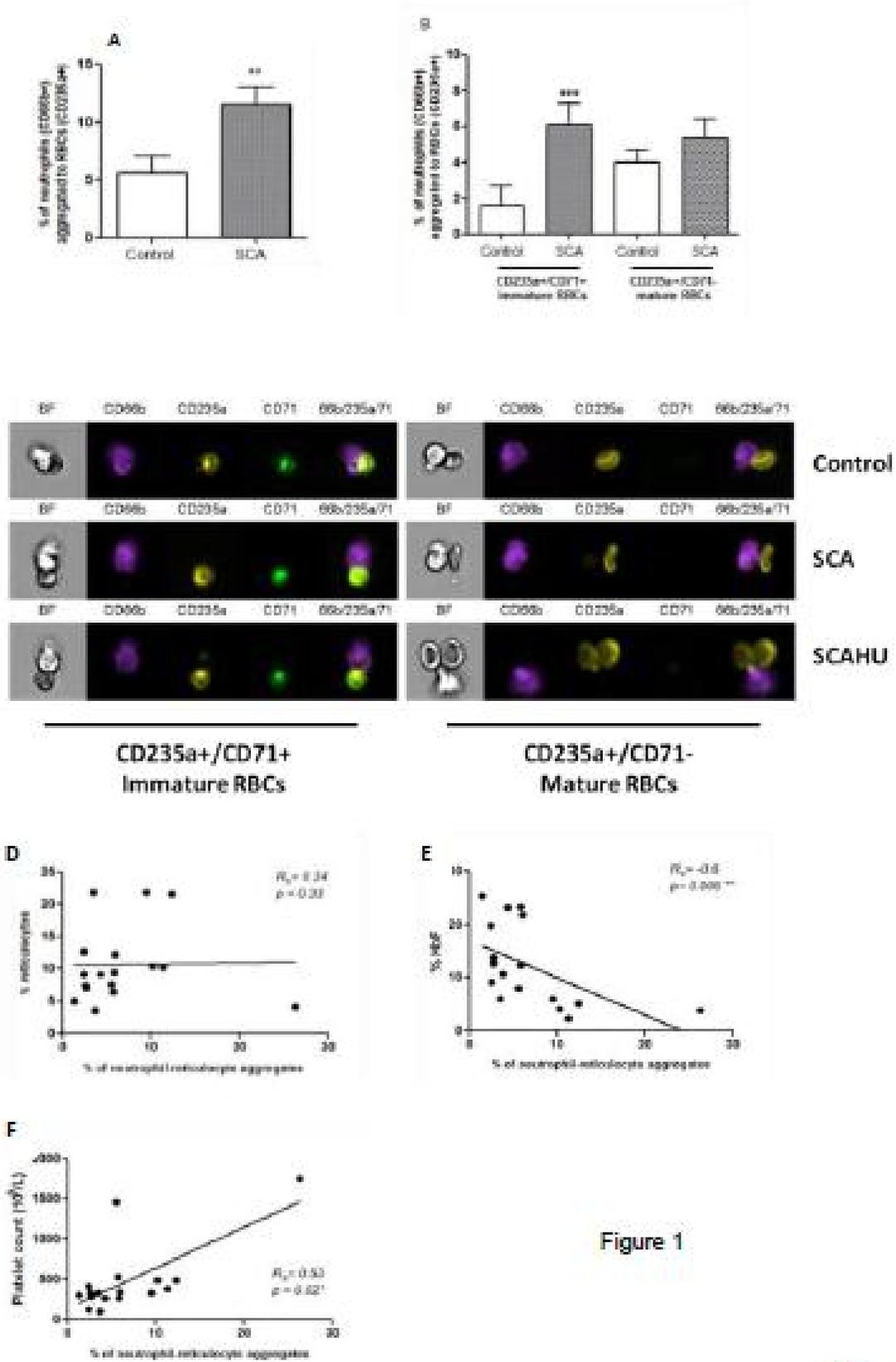
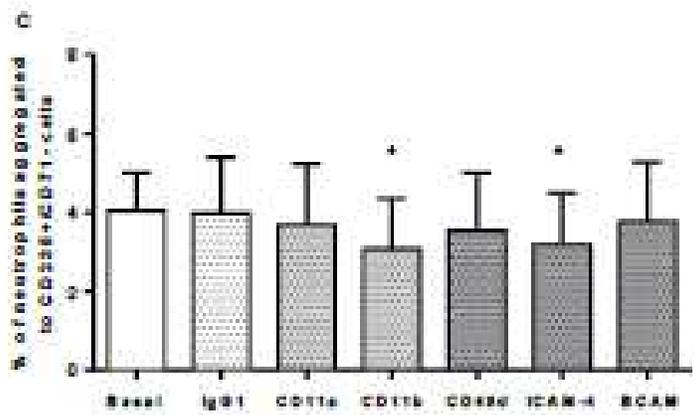
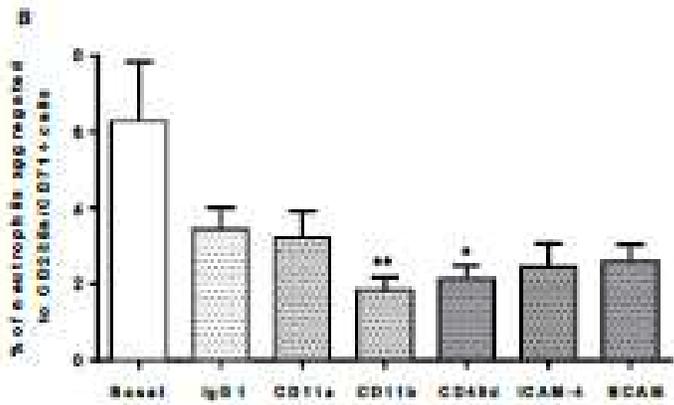
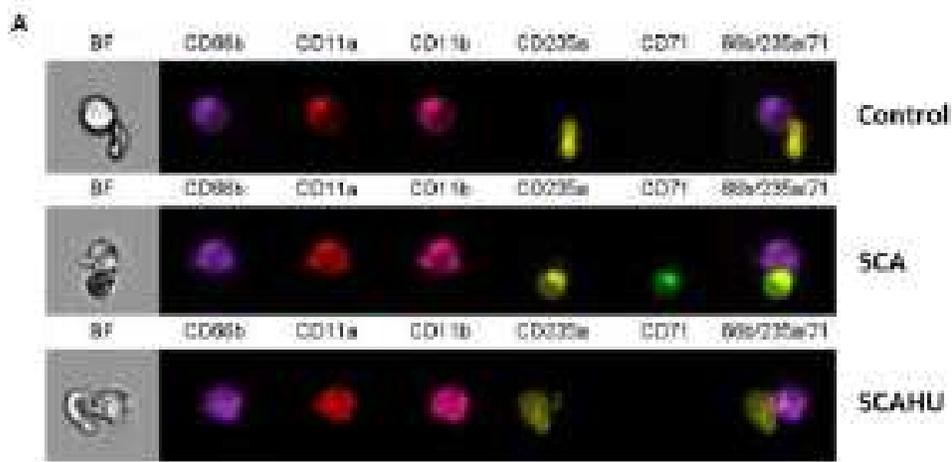
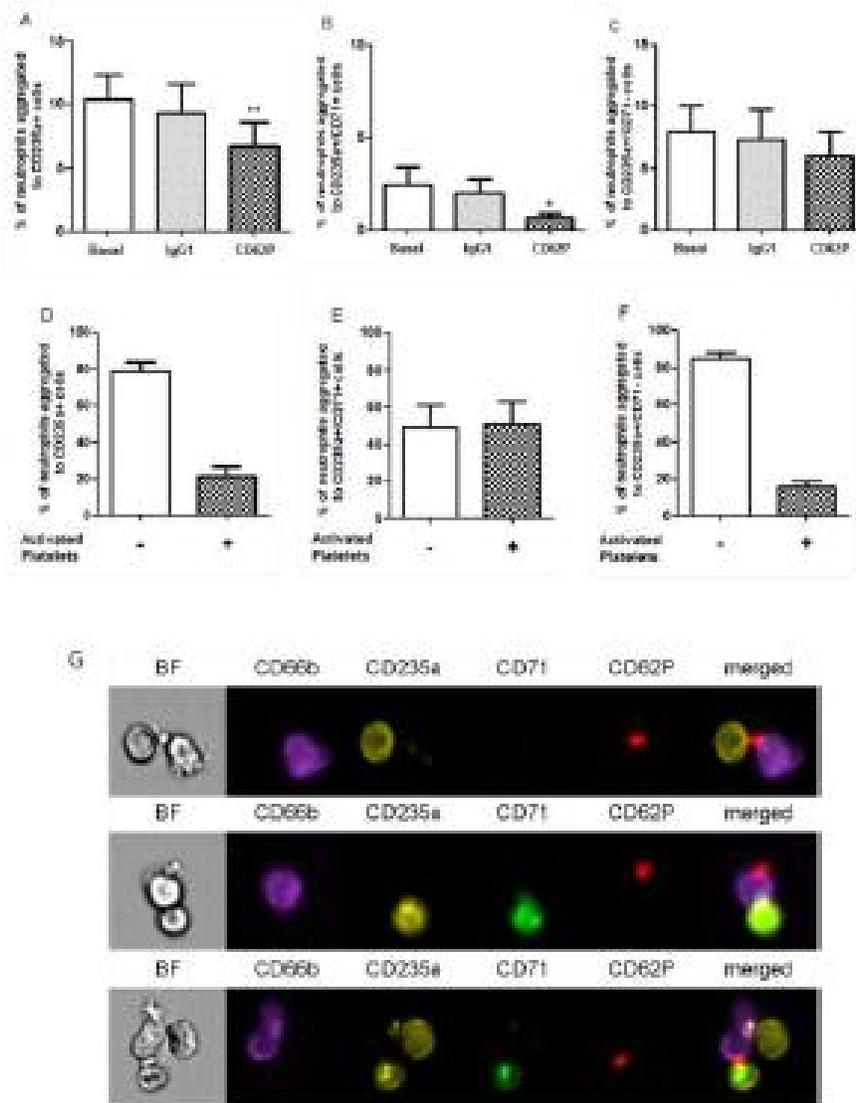


Figure 1



**Figure 2**



**Figure 3**

---

Assunto: Fwd: HAEMATOL/2014/108555 Acknowledgment of receipt of new paper

De: Nicola Couran (couran@unicamp.br)

Para: veninamarcela@yahoo.com.br

Data: Quarta-feira, 14 de Maio de 2014 17:07

---

----- Mensagem original -----

Assunto: HAEMATOL/2014/108555 Acknowledgment of receipt of new paper

Data: Mon, 7 Apr 2014 02:54:49 -0700 (PDT)

De: office@haematologica.org

Para: Venina M. Dominical <veninamarcela@yahoo.com.br>, Leigh Samsel <samsell@nhlbi.nih.gov>, James S. Nichols <jnichols@nhlbi.nih.gov>, Sara Saad <sara@unicamp.br>, Fernando F. Costa <ferreira@unicamp.br>, John Philip McCoy <mccoyj@nhlbi.nih.gov>, Nicola Couran <couran@unicamp.br>

Dear Authors:

Re: HAEMATOL/2014/108555 entitled "Prominent role of platelets in the formation of circulating neutrophil heterocellular aggregates in the blood of patients with sickle cell anemia".

Please note that the above mentioned manuscript has been submitted to Haematologica by the corresponding author Gregory J Kato. This manuscript is currently undergoing a peer-review evaluation process (<http://www.icmje.org/#peer>).

Let us remind you that - according to the International Committee of Medical Journal Editors (<http://www.icmje.org/#author>) - authorship credit should be based on: 1) substantial contributions to conception and design, acquisition of data, or analysis and interpretation of data; 2) drafting the article or revising it critically for important intellectual content; and 3) final approval of the version to be published. Authors should meet conditions 1, 2, and 3. We are conducting the peer-review evaluation under the assumption that each of you meets these conditions.

Haematologica will communicate the editorial decision concerning this manuscript to the corresponding author, who will be in charge of informing all authors.

Please do not hesitate to contact us should you have any problem.

Best regards,

Haematologica Journal Office  
office@haematologica.org



**APÊNDICE** – Artigo submetido em 30 de abril de 2014.

**In vitro microfluidic model for the study of vaso-occlusive processes in capillary-mimetizing biochips**

Domínguez VM<sup>1</sup>, Vital DM<sup>1</sup>, O'Dowd F<sup>2</sup>, Saad STO<sup>1</sup>, Costa FF<sup>1</sup>, Conran N<sup>1</sup>.

**Brief Communication**

<sup>1</sup> INCT de Sangue, Hematology and Hemotherapy Center, School of Medicine, University of Campinas – UNICAMP, Campinas, Sao Paulo, Brazil.

<sup>2</sup> Cellix Ltd., Unit 1, Longmile Business Park, Longmile Road, Dublin, Ireland.

**Running title:** In vitro model for the study of vaso-occlusion

Correspondence to: N. Conran, Ph.D., Hemocentro, Rua Carlos Chagas, 480, Cidade Universitária, Barão Geraldo, Campinas 13083-970-SP, Brazil. e-mail: conran@unicamp.br,

Tel: + 55 19 3521 8533; Fax: + 55 19 3289 1089.

## Abstract

Sickle cell disease vaso-occlusion, responsible for much of the morbidity of the disease, is a complex multicellular process, apparently triggered by leukocyte adhesion to the vessel wall. The microcirculation represents a major site of leukocyte-endothelial interactions and vaso-occlusive processes. We have developed a biochip with microchannels resembling anastomosing capillaries, of diameters decreasing from 40  $\mu\text{m}$  to 10  $\mu\text{m}$  in width, for use in conjunction with a precise microfluidic device to mimic cell flow and adhesion through capillary-sized channels. The biochips were utilized to observe the dynamics of the passage of neutrophils and red blood cells, isolated from healthy (CON) and sickle cell anemia (SCA) individuals, through laminin or endothelial adhesion molecule-coated channels at physiologically-relevant rates of flow and shear stress. Obstruction of E-selectin/ICAM-1 coated biochip microchannels by SCA neutrophils was significantly greater than that observed for CON neutrophils, particularly in the microchannels of 40-15  $\mu\text{m}$  in width. While SCA RBC alone did not significantly adhere to or obstruct microchannels, mixed suspensions of SCA neutrophils and RBCs significantly adhered to and obstructed laminin-coated channels. Results support a primary role for leukocytes in the initiation of SCA occlusive processes in the microcirculation. This assay represents an easy-to-use and reproducible *in vitro* technique for understanding molecular mechanisms and cellular interactions occurring in the microvasculature, and for testing drugs with the potential to inhibit occlusive mechanisms such as those observed in SCA and thrombotic diseases.

**Key words:** Capillaries; Leukocytes; Microfluidics; Occlusion; Sickle Cell Disease.

## Introduction

Alterations in cellular biophysical properties, such as cell adhesion, and interactions between blood cells and the endothelium can contribute to vascular occlusion, as occurs in sickle cell disease (SCD), and also observed in thrombotic processes [1]. The pathophysiology of SCD is extremely complex [2] and, while hemoglobin S polymerization constitutes the major pathophysiological mechanism of this genetic disease, vaso-occlusive processes constitute its major manifestation [3]. Leukocytes have been strongly implicated in the inflammatory processes that are associated with SCD [4], and experimental evidence indicates that inflammatory processes and the adhesion of neutrophils to the vessel wall, followed by their interactions with other blood cells, may initiate vaso-occlusive processes [5-7].

Microfluidic technology presents significant potential for advancing cell biology research. The ability to manipulate small volumes of fluid in micro-sized channels, capillaries, and other conduits has led to innovative approaches for understanding fundamental biology [8]. To date, parallel flow chambers have been used extensively to study the adhesion dynamics between blood cells and the endothelium or adhesion molecules [9], and such procedures have led to important advances in our understanding of hematological pathology [9] and vascular mechanisms occurring in SCD [10-15]. However, traditional microfluidic devices, such as the parallel plate, do not accurately reproduce the bifurcations and geometry of *in vivo* microvascular networks and only mimic flow in larger vessels. A complex microfluidic device with a vascular network reaching dimensions of 7-60- $\mu\text{m}$  wide previously demonstrated that polymerization of sickle cell hemoglobin is sufficient to cause channel obstruction by red cells [16]. More recently, microfluidic technology was used to successfully model microvascular occlusion by blood cells from SCD patients in an endothelialized chip with bifurcating channels of decreasing channel widths that reached a minimum of 30  $\mu\text{m}$  [1].

Since post-capillary venules are the major site of leukocyte-endothelial interactions [17] and human pulmonary and skin capillaries can present diameters as small as 5-10  $\mu\text{m}$  [18, 19], occasionally being even smaller than circulating neutrophils in diameter, we have developed a biochip with channels resembling anastomosing microcapillaries that reach diameters of approximately 10  $\mu\text{m}$ . The biochips were designed for ease of use in conjunction with a precise microfluidic device to mimic cell flow, adhesion and agglomeration of cells, with the aim of providing a realistic model of *in vivo* flow conditions in capillary networks of the microcirculation. Furthermore, we utilized the chips to observe the dynamics of the passage of neutrophils and red blood cells (RBC), isolated from healthy and sickle cell anemia individuals, through these channels.

## Methods

### *Design of 5-Channel Microcapillary Biochips*

The eight-channel microcapillary biochips were designed in collaboration with Cellix Ltd (Dublin, Ireland). Each parallel channel has a width of 400  $\mu\text{m}$  and depth of 50  $\mu\text{m}$ , and contains pillars arranged in columns in the channel. Columns of pillars were spaced at intervals of approximately 35  $\mu\text{m}$ . Each pillar has a diameter of approximately 38  $\mu\text{m}$  and the spaces between the pillars in each column decrease proportionally: The lateral spaces between the pillars of the first column measure 40 $\mu\text{m}$ , while the pillars of the last column are spaced at approximately every 10 $\mu\text{m}$  (Figure 1). As such, these channels simulate anastomosing and branching capillaries.

### *Subjects*

Healthy control (Con, total N=13) individuals and sickle cell anemia (SCA; total N=14) patients (aged 18–60 years) in steady-state, were recruited at the Hematology and Hemotherapy center, University of Campinas, Brazil. Patients were not in crisis, and none had received blood transfusions in the preceding 3 months. Of the SCA patients, 3 were on hydroxyurea (HU) therapy (15–30 mg/kg/d HU  $\geq$  3 months). Healthy controls (HbAA) were age- and gender-matched, where possible, to SCA patients and samples were analyzed concomitantly. Informed written consent was obtained from all subjects; the study was approved by the Ethics Committee of the University of Campinas.

#### *Cell Separation*

Neutrophils were isolated from peripheral blood collected in sodium citrate by centrifuging over a Ficoll-Paque gradient (1.077/1.119 g/l). Contaminating erythrocytes were removed using lysis buffer (155 mM NH<sub>4</sub>Cl, 10 mM KHCO<sub>3</sub>) and cells resuspended in phosphate buffer saline (PBS, 5 $\times$ 10<sup>6</sup>/mL, pH=7.4). For experiments with RBC, peripheral blood was centrifuged (500  $\times$  g) and cells resuspended in PBS (1 $\times$ 10<sup>7</sup>/mL).

#### *Venaflex® Microfluidic Assay*

The Venaflex® microfluidic system (Cellix Ltd.) consists of a Mirus™ nanopump 2.0 Evo that draws fluids and cells over the biochip channels, employing a patented flow damper and controlled by a PC, using dedicated software (Cellix Ltd.). Before assays, biochip channels were coated with ligands: 1.25  $\mu$ g/cm<sup>2</sup> recombinant ICAM-1 and 0.25  $\mu$ g/cm<sup>2</sup> E-selectin (R&D Systems, Minneapolis, MN) or 2.0  $\mu$ g/cm<sup>2</sup> human laminin (Sigma Aldrich, St Louis, MO) for 2 h (room temperature, RT). Non-specific binding sites were then blocked with

1%(w/v) BSA (30 min, RT). Prepared chips were stored in a humidified chamber and used almost immediately in assays.

Cell suspensions were applied to the entry wells of microchannels; an initial flow rate of 3.3 nL/s ( $0.2 \text{ d}/\text{cm}^2$  initial shear stress) or 8.3 nL/s ( $0.5 \text{ d}/\text{cm}^2$ ) was used to draw neutrophils or neutrophil/RBC suspensions through the channel, respectively. Flow was maintained for 3 min and 180 images were acquired (1 per second) using a Zeiss microscope (X20 lens) and DeltaPix Camera. Images were analyzed using Axiovision software (Zeiss), measuring the darkness of the image (in A.U.) to provide a qualitative value of channel obstruction. Data are depicted as means  $\pm$  SEM; the Mann Whitney test was utilized for statistical comparisons (GraphPad Prism 6.02).

## Results and Discussion

To develop a more physiologically-relevant *in vitro* assay to better comprehend the interactions between cells in the microvasculature, we designed a new biochip to reproduce capillary geometry for use in conjunction with a microfluidic platform. The new biochip (Figure 1) demonstrated compatibility with the Venaflex platform, and adjustable initial flow rates were maintained for the design of the biochip.

To test the ability of these chips to monitor alterations in the biophysical properties of cells, we investigated the dynamics of the flow of RBC and leukocytes, separated from healthy control (CON) individuals and from steady-state SCA patients, through the microcapillaries. Previous *in vitro* studies have demonstrated that both SCA RBC and leukocytes demonstrate increased adhesive properties [11, 15, 20-27]; furthermore, intravital microscopy techniques indicate that neutrophil adhesion, followed by secondary red cell adhesion, appear to trigger inflammatory vaso-occlusive processes in sickle mice models [4,

12, 28, 29]. Initially, the biochip microchannels were coated with laminin, a major ligand for the BCAM/Lu receptor [30], and RBC from CON or SCA subjects were applied to channels (initial flow rate of 3.3-8.3 nL/s). Augmented SCA red cell adhesion to laminin has been previously reported in large caliber parallel plate flow adhesion assays [23, 30] and, indeed, observed by ourselves employing 400- $\mu$ m-wide biochip channels (data not shown). However, SCA RBC adhesion and consequent obstruction of the microcapillaries of the new biochip was negligible for both groups ( $0.0\pm 0.0$  and  $0.07\pm 0.1$  A.U., for CON (N=8) and SCA (N=14), 3.3 nL/s, respectively,  $P>0.05$ ). Findings corroborate previous data indicating that red cells have a relatively low adhesive capacity, particularly at the high shear stresses that are generated in capillaries of small caliber, as encountered in the biochip [31-33].

Leukocyte adhesion may initiate vaso-occlusive processes in SCA and as human neutrophils can present diameters that are larger than those of some capillaries [19], and are less flexible than RBC [34], it seems probable that the capillaries are major sites of leukocyte-mediated obstruction. Neutrophils from CON and SCA individuals were perfused through channels coated with E-selectin and ICAM-1 (initial flow rate of 3.3 nL/s). After 180s, SCA neutrophils were found to obstruct the microchannels significantly more than CON neutrophils (Figure 2A-C). Calculating the level of obstruction in each microchannel column, we found that neutrophils from SCA patients adhered and obstructed channels of widths of 40, 30, 25 and 15  $\mu$ m (Figure 3A, C), significantly more than CON neutrophils, for which major obstruction was observed only in the smallest microchannels (15 and 10  $\mu$ m) (Figure 3A-B). Our data corroborate previous findings [5][15, 20] indicating that SCA neutrophils are highly adhesive and suggest that leukocytes are capable of causing major obstruction in vessels of equivalent size to those of the microcirculation.

Since both leukocytes (particularly neutrophils) and RBC may participate in vaso-occlusive processes, we also analyzed the obstruction of the microchannels by mixed

suspensions of neutrophils ( $5 \times 10^6$  cells/ml) and RBCs ( $1 \times 10^7$  cells/ml), each from the same individual. Neutrophil/RBC suspensions were perfused over laminin-coated channels. Interestingly, when this combination of cells was employed, even greater obstruction of the channels was observed for the SCA cells, compared to that observed for just SCA neutrophils (E-selectin/ICAM-1) or SCA RBC alone (Figure 4). It is possible that SCA RBC may interact with SCA neutrophils, leading to further obstruction of microchannels; alternatively, when microchannels are perfused with obstructing and less flexible neutrophils, SCA RBC may become trapped between the cells causing further obstruction.

In conclusion, we describe a novel and reproducible *in vitro* methodology for monitoring the capacity of cells to obstruct and adhere to capillary-sized microchannels. This methodology presents utility for modeling cell interactions in microvessels and for the study of obstructive mechanisms occurring in the microcirculation, as may occur in a number of conditions, including SCA and thrombotic disorders. We also utilized the biochip to observe the high potential that neutrophils from SCA individuals, in the absence and presence of autologous RBC, have to adhere and obstruct microchannels. This assay may be utilized to further understand molecular mechanisms occurring in the microvasculature and to test drugs with the potential to inhibit these cellular interactions and, consequently, occlusion.

#### **Acknowledgments**

The authors thank FAPESP and CNPq for supporting this study (FAPESP grants: 2010/17320-0 and 2010/18386-4).

#### **Conflicts of Interest**

The authors have no conflicts of interest to declare.

## References

- [1] Tsei M, Kita A, Leach J, et al. In vitro modeling of the microvascular occlusion and thrombosis that occur in hematologic diseases using microfluidic technology. *The Journal of clinical investigation*. 2012;122:408-418.
- [2] Stuart MJ, Nagel RL. Sickle-cell disease. *Lancet*. 2004;364:1343-1360.
- [3] Chiang EY, Frenette PS. Sickle cell vaso-occlusion. *Hematology - Oncology Clinics of North America*. 2003;19:771-784.
- [4] Turhan A, Weiss LA, Mohandas N, Collier BS, Frenette PS. Primary role for adherent leukocytes in sickle cell vascular occlusion: a new paradigm. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2002;99:3047-3051.
- [5] Fadlon E, Vordermeier S, Pearson TC, et al. Blood polymorphonuclear leukocytes from the majority of sickle cell patients in the crisis phase of the disease show enhanced adhesion to vascular endothelium and increased expression of CD64. *Blood*. 1998;91:266-274.
- [6] Land LR, Mul FP, de Haas M, Roos D, Duits AJ. Neutrophil activation in sickle cell disease. *Journal of leukocyte biology*. 1999;66:411-415.
- [7] Belcher JD, Marker PH, Weber JP, Hebbel RP, Vercellotti GM. Activated monocytes in sickle cell disease: potential role in the activation of vascular endothelium and vaso-occlusion. *Blood*. 2000;96:2491-2499.
- [8] Young EW, Beebe DJ. Fundamentals of microfluidic cell culture in controlled microenvironments. *Chemical Society reviews*. 2010;39:1036-1048.
- [9] Wong KH, Chan JM, Kamm RD, Tien J. Microfluidic models of vascular functions. *Annual review of biomedical engineering*. 2012;14:209-230.
- [10] Zen Q, Cottman M, Truskey G, Fraser R, Telen MJ. Critical factors in basal cell adhesion molecule/lutheran-mediated adhesion to laminin. *The Journal of biological chemistry*. 1999;274:728-734.
- [11] Zennadi R, De Castro L, Elyer C, Xu K, Ko M, Telen MJ. Role and regulation of sickle red cell interactions with other cells: ICAM-4 and other adhesion receptors. *Transfusion clinique et biologique : journal de la Societe francaise de transfusion sanguine*. 2008;15:23-28.
- [12] Zennadi R, Moeller BJ, Whalen EJ, et al. Epinephrine-induced activation of LW-mediated sickle cell adhesion and vaso-occlusion in vivo. *Blood*. 2007;110:2708-2717.
- [13] El Nemer W, Gauthier E, Wautier MP, et al. Role of Lu/BCAM in abnormal adhesion of sickle red blood cells to vascular endothelium. *Transfusion clinique et biologique : journal de la Societe francaise de transfusion sanguine*. 2008;15:29-33.
- [14] Gauthier E, Rahuel C, Wautier MP, et al. Protein kinase A-dependent phosphorylation of Lutheran/basal cell adhesion molecule glycoprotein regulates cell adhesion to laminin alpha5. *The Journal of biological chemistry*. 2003;280:30055-30062.

- [15] Finnegan EM, Turhan A, Galan DE, Barabino GA. Adherent leukocytes capture sickle erythrocytes in an in vitro flow model of vaso-occlusion. *American journal of hematology*. 2007;82:266-275.
- [16] Higgins JM, Eddington DT, Bhatia SN, Mahadevan L. Sickle cell vasoocclusion and rescue in a microfluidic device. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2007;104:20496-20500.
- [17] Springer TA. Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell*. 1994;76:301-314.
- [18] Lipowsky HH, Williams ME. Shear rate dependency of red cell sequestration in skin capillaries in sickle cell disease and its variation with vasoocclusive crisis. *Microcirculation*. 1997;4:289-301.
- [19] Doerschuk CM, Beyers N, Coxson HO, Wiggs B, Hogg JC. Comparison of neutrophil and capillary diameters and their relation to neutrophil sequestration in the lung. *Journal of applied physiology*. 1993;74:3040-3045.
- [20] Canali AA, Franco-Penteado CF, Saad ST, Conran N, Costa FF. Increased adhesive properties of neutrophils in sickle cell disease may be reverted by pharmacological nitric oxide donation. *Haematologica*. 2008;93:605-609.
- [21] Haynes J, Jr., Obiako B, Hester RB, Baliga BS, Stevens T. Hydroxyurea attenuates activated neutrophil-mediated sickle erythrocyte membrane phosphatidylserine exposure and adhesion to pulmonary vascular endothelium. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology*. 2008;294:H379-385.
- [22] Brittain JE, Knoll CM, Ataga KI, Oringer EP, Parise LV. Fibronectin bridges monocytes and reticulocytes via integrin alpha4beta1. *British journal of haematology*. 2008;141:872-881.
- [23] Zen Q, Batchvarova M, Twyman CA, et al. B-CAM/LU expression and the role of B-CAM/LU activation in binding of low- and high-density red cells to laminin in sickle cell disease. *American journal of hematology*. 2004;75:63-72.
- [24] Hillery CA, Du MC, Montgomery RR, Scott JP. Increased adhesion of erythrocytes to components of the extracellular matrix: isolation and characterization of a red blood cell lipid that binds thrombospondin and laminin. *Blood*. 1996;87:4879-4886.
- [25] Barabino GA, McIntire LV, Eskin SG, Sears DA, Udden M. Rheological studies of erythrocyte-endothelial cell interactions in sickle cell disease. *Progress in clinical and biological research*. 1987;240:113-127.
- [26] Hebbel RP, Yamada O, Moldow CF, Jacob HS, White JG, Eaton JW. Abnormal adherence of sickle erythrocytes to cultured vascular endothelium: possible mechanism for microvascular occlusion in sickle cell disease. *The Journal of clinical investigation*. 1980;65:154-160.
- [27] Hoover R, Rubin R, Wise G, Warren R. Adhesion of normal and sickle erythrocytes to endothelial monolayer cultures. *Blood*. 1979;54:872-876.

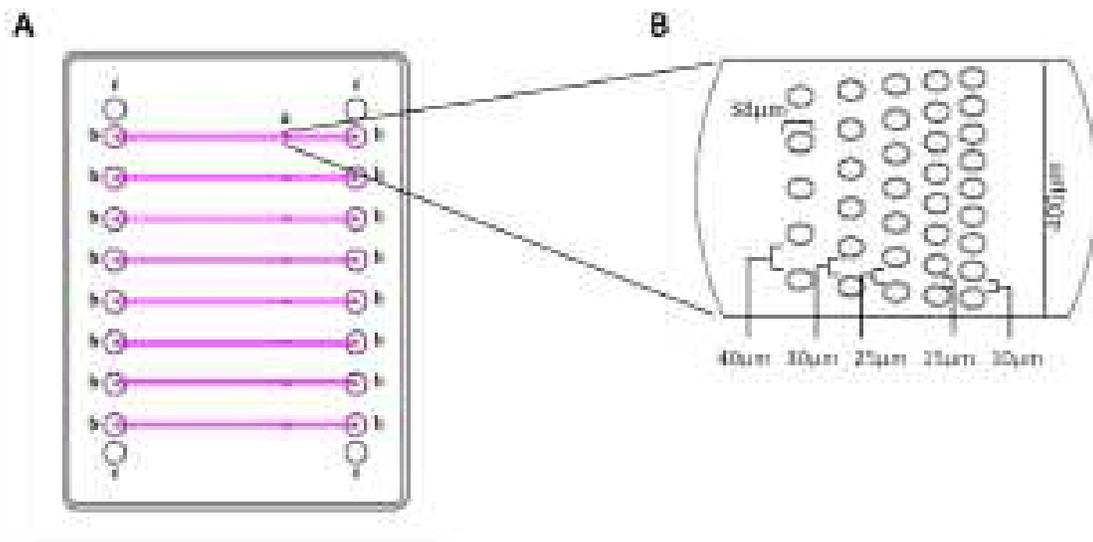
- [28] Chang J, Shi PA, Chiang EY, Frenette PS. Intravenous immunoglobulins reverse acute vaso-occlusive crises in sickle cell mice through rapid inhibition of neutrophil adhesion. *Blood*. 2008;111:915-923.
- [29] Turhan A, Jenab P, Bruhns P, Ravetch JV, Collier BS, Frenette PS. Intravenous immune globulin prevents venular vaso-occlusion in sickle cell mice by inhibiting leukocyte adhesion and the interactions between sickle erythrocytes and adherent leukocytes. *Blood*. 2004;103:2397-2400.
- [30] Bartolucci P, Chara V, Picot J, et al. Decreased sickle red blood cell adhesion to laminin by hydroxyurea is associated with inhibition of Lu/BCAM protein phosphorylation. *Blood*. 2010;116:2152-2159.
- [31] Wagner MC, Eckman JR, Wick TM. Sickle cell adhesion depends on hemodynamics and endothelial activation. *The Journal of laboratory and clinical medicine*. 2004;144:260-267; discussion 227-268.
- [32] Koutsouris AG, Tachmitzi SV, Batis N. Wall shear stress quantification in the human conjunctival pre-capillary arterioles in vivo. *Microvascular research*. 2013;83:34-39.
- [33] Koutsouris AG, Tachmitzi SV, Batis N, et al. Volume flow and wall shear stress quantification in the human conjunctival capillaries and post-capillary venules in vivo. *Biorheology*. 2007;44:375-386.
- [34] Downey GP, Worthen GS. Neutrophil retention in model capillaries: deformability, geometry, and hydrodynamic forces. *Journal of applied physiology*. 1988;63:1861-1871.

**Figure 1.** Design of microcapillary biochips. (A) Schematic design of biochips with 8 channels, each of 400  $\mu\text{m}$  in width and 50 $\mu\text{m}$  in depth; each channel contains a single group of five columns of pillars. (B) Enlarged section of the microchannel (view from above) demonstrating the layout of the pillars inside each microchannel. Each channel contains five columns of pillars spaced at intervals of approximately 35  $\mu\text{m}$ . Each pillar has a diameter of approximately 38  $\mu\text{m}$  and the spaces between pillars decrease proportionally in each column.

**Figure 2.** Neutrophils from SCA individuals obstruct microcapillary chips significantly more than healthy control neutrophils. (A) Obstruction of the microchannel area of biochips (area of 0.186  $\mu\text{m}^2$ ) by neutrophils from control (CON, N=11) and SCA patients in steady state (N=12; including 3 patients on HU therapy). (B, C) Representative images of obstruction of microchannels at 180s by CON and SCA neutrophils, respectively. X 100 final magnification. (D) Quantification of the obstruction of each column of pillars, according to the spaces between each post (40 $\mu\text{m}$  - 10 $\mu\text{m}$ ) by CON and SCA neutrophils. Neutrophils ( $5 \times 10^6/\text{mL}$ ) were perfused through channels coated with ICAM-1 (1.25  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) E-selectin (0.25  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) at an initial flow rate of 3.3 nL/s (equivalent to 0.2  $\text{dyn}/\text{cm}^2$  initial shear stress at channel entrance) for 3 min. Obstruction was quantified as A.U. and calculated using AxioVision LE64 Zeiss software \*, P<0.05; \*\*, P<0.01, compared to CON group, Mann Whitney test.

**Figure 3.** Neutrophils and RBCs from SCA individuals significantly obstruct microcapillary biochips. Neutrophils ( $5 \times 10^6$  cells/mL) and RBCs ( $1 \times 10^7$  cells/mL) from control individuals (CON, N=13) and SCA patients (N=12) in steady state were perfused over laminin-coated microchannels (2  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) at an initial flow rate of 8.3 nL/s (initial shear stress of 0.5  $\text{dyn}/\text{cm}^2$ ) for 3 min. (A) Obstruction of each microchannel section (area of 0.186  $\mu\text{m}^2$ ) was

quantified as A.U. and calculated using AxioVision LE64 Zeiss software. (B) X100 and (C) X200 final magnification \*P<0.05, compared to CON group, Mann Whiney test.



**Figure 1**

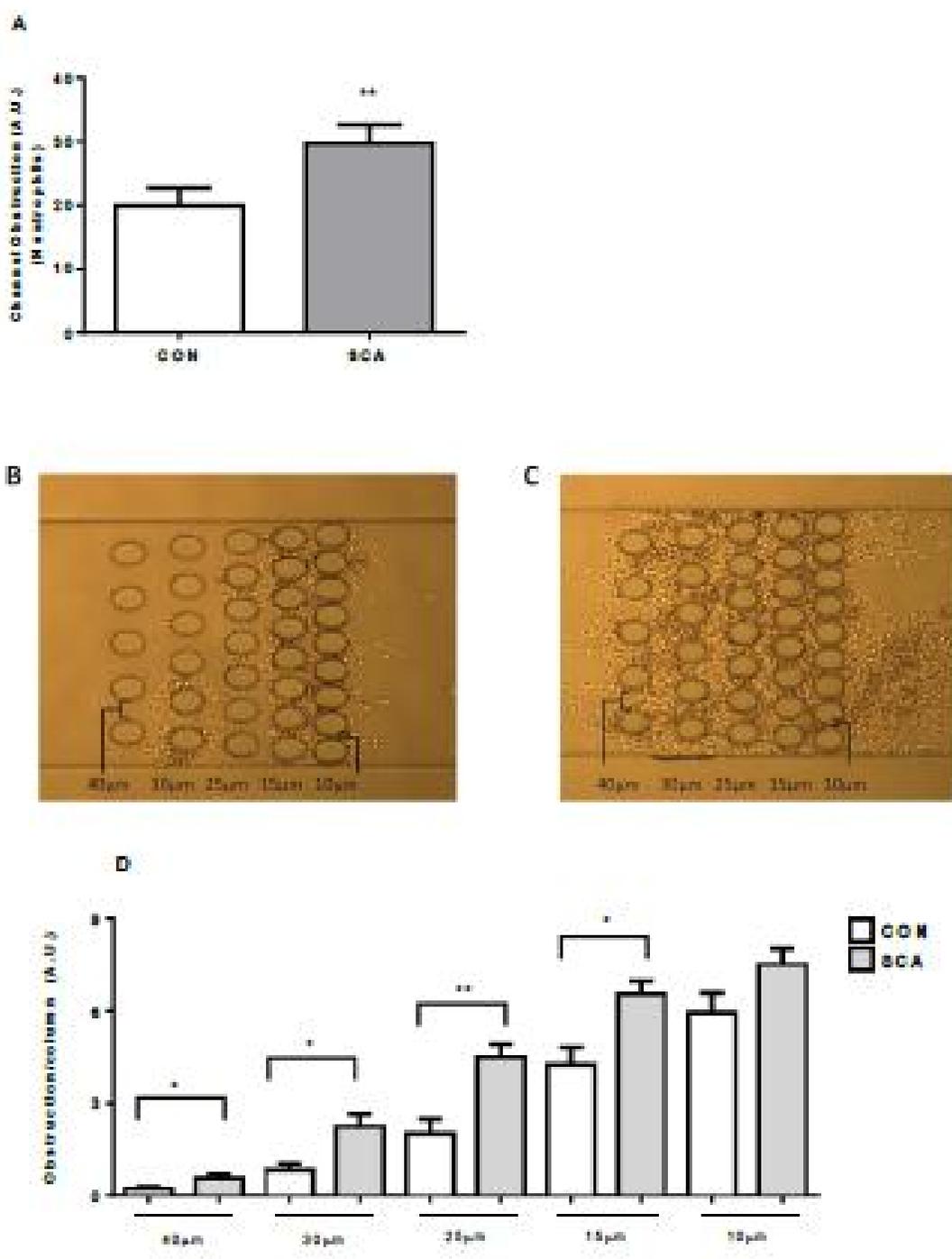
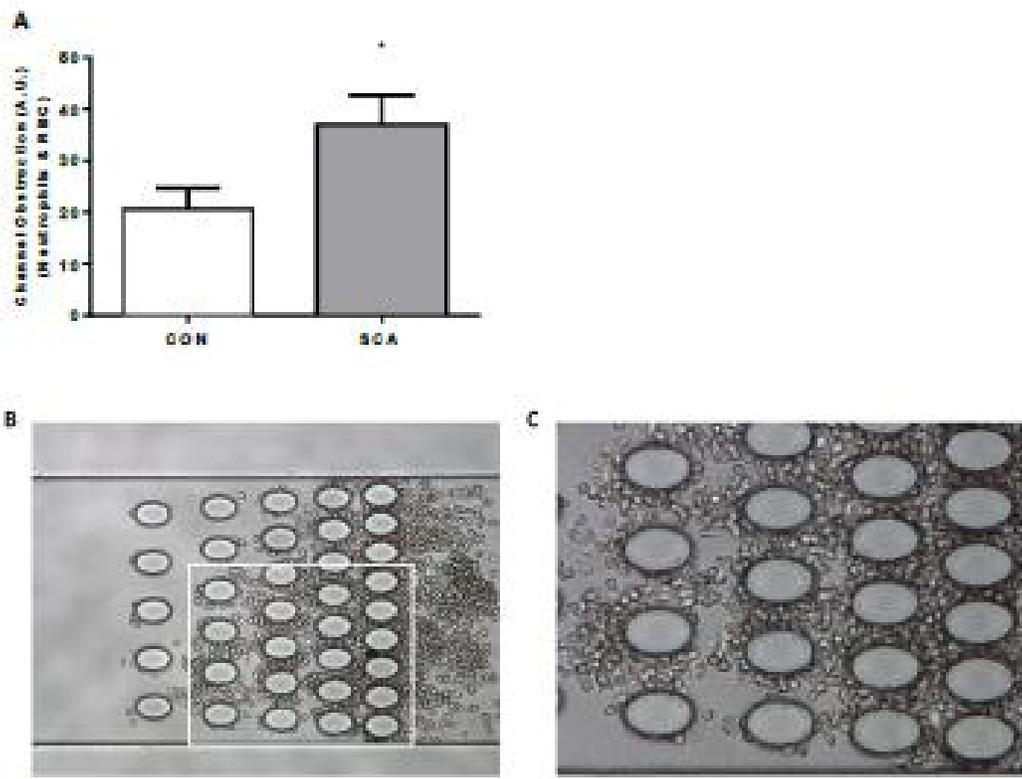


Figure 2



**Figure 3**

10/6/2014

Imprimir

---

**Assunto:** Fwd: A manuscript number has been assigned to In vitro microfluidic model for the study of vaso-occlusive processes in capillary-mimeticizing biochips  
**De:** Nicola Conran (conran@unicamp.br)  
**Para:** veninamarcia@yahoo.com.br,  
**Data:** Quarta-feira, 14 de Maio de 2014 17:08

---

----- Mensagem original -----

**Assunto:** A manuscript number has been assigned to In vitro microfluidic model for the study of vaso-occlusive processes in capillary-mimeticizing biochips  
**Data:** 30 Apr 2014 17:53:12 +0100  
**De:** Experimental Hematology <exphem@elsevier.com>  
**Para:** conran@unicamp.br

Dear Dr. Conran,

Your submission entitled "In vitro microfluidic model for the study of vaso-occlusive processes in capillary-mimeticizing biochips" has been assigned a manuscript number. You will be able to check on the progress of your paper by logging on to ESI as an author. The URL is <http://esi.elsevier.com/exphem/>.

Your manuscript has received the prompt attention of our Editorial Board. Authors usually receive the editorial decision within 4 weeks. Please note the number assigned to your manuscript, listed above. Refer to this number when contacting us about your manuscript to avoid confusion. As stated in our "Instructions for Contributors," Experimental Hematology requires a submission fee of \$50 to process regular manuscripts. To pay the submission fee by credit card please use the following link [https://www.elsevier.com/store/view\\_product.asp?id=653391](https://www.elsevier.com/store/view_product.asp?id=653391). You must pay the submission fee before we can release the editorial decision. Please note that we cannot release the editorial decision if we have not received the submission fee.

Authors are also required to fill out an Authorship Statement form at the time of manuscript submission. The statement must include the following information. Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,

Sharna Sever,   
Journal Manager  
Experimental Hematology  
11667 Adie Road  
St. Louis, MO 63043

Phone (314) 255-1437  
Fax (314) 567-7178  
E-mail: [exphem@elsevier.com](mailto:exphem@elsevier.com) or [s.sever@elsevier.com](mailto:s.sever@elsevier.com)