

SHELEY GAMBERO

**EFEITOS DA HIDROXIURÉIA E DE DOADORES DE
ÓXIDO NÍTRICO NA EXPRESSÃO E FUNÇÃO DAS
MOLÉCULAS DE ADESÃO EM CÉLULAS VERMELHAS
DE PACIENTES COM ANEMIA FALCIFORME**

CAMPINAS

2006

SHELEY GAMBERO

**EFEITOS DA HIDROXIUREIA E DE DOADORES DE
OXIDO NÍTRICO NA EXPRESSÃO E FUNÇÃO DAS
MOLÉCULAS DE ADESÃO EM CÉLULAS VERMELHAS
DE PACIENTES COM ANEMIA FALCIFORME**

*Dissertação de Mestrado apresentada à Pós-Graduação da
Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de
Campinas para Obtenção do título de mestre em Ciências Médicas,
área de concentração em Ciências Biomédicas.*

ORIENTADOR: DR. FERNANDO FERREIRA COSTA

CO-ORIENTADORA: DRA. NICOLA CONRAN

CAMPINAS

2006

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

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

G142e Gambero, Sheley
Efeitos da hidroxiureia e de doadores de oxido nítrico na expressão e função das moléculas de adesão em células vermelhas de pacientes com anemia falciforme. / Sheley Gambero. Campinas, SP : [s.n.], 2006.

Orientadores : Fernando Ferreira Costa; Nicola Conran
Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Ciências Médicas.

1. Anemia falciforme. 2. Hidroxiureia. 3. Moléculas de adesão. 4. Expressão gênica. I. Costa, Fernando Ferreira. II. Conran, Nicola. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

Título em ingles: Effect of hydroxyurea and nitric oxide donors in the expression and function of adhesion molecules in red blood cells of sickle cell disease.

Keywords:

- **Sickle cell disease**
- **Hydroxyurea**
- **Cell adhesion molecules**
- **Gene expression**

Área de Concentração: Patologia Clínica

Titulação: Mestrado em Ciências Médicas

Banca examinadora: Prof^o.Dr^o. Fernando Ferreira Costa; Prof^o.Dr^o. Vagner de Castro; Prof^a Dr^a Heloisa Helena de Araújo Ferreira.

Data da defesa: 28 - 07 - 2006

DEDICO

Aos meus pais Antonio e Célia, meus exemplos, por acreditarem em mim e em meus sonhos, pela paciência, amor e carinho, por estarem ao meu lado em todos os momentos de minha vida.

Lê e Fran, pelo apoio e torcida, por estarem sempre ao meu lado, por me ensinarem que sempre vale a pena lutar por aquilo que queremos, por serem meu apoio e meus exemplos.

Lauro, pelo apoio, exemplo, e por estar sempre disposto a me ensinar e discutir trabalho e idéias.

Kieran, que com sua simplicidade de criança, sempre me ensina que a vida pode ser muito mais fácil com um simples sorriso, por tornar a nossa vida mais completa.

Pri, amiga, irmã, com certeza um anjo na minha vida, por todos os momentos que passamos juntas, pelo carinho e paciência em me ouvir sempre.

A todos vocês por fazerem parte da minha família e minha vida. Amo vocês!!!

AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Fernando, pela orientação, apoio e confiança, pelos ensinamentos e exemplo.

À Nicola, por ter acreditado em mim, pela confiança, orientação em todos os momentos, pela paciência e amizade.

Ao Dr. Vagner e à Dra Heloisa pela disponibilidade, sugestões e correções.

À Dul, pela amizade, convivência, companheirismo, atenção, ajuda, disponibilidade, ensinamentos e exemplo de profissionalismo.

Laboratório de Hematologia, especialmente à Mônica, pela atenção e suporte.

Fernanda e Alan do Laboratório de Marcadores Celulares, pela disponibilidade, atenção e ajuda.

Carol, Camila e Babi, pela amizade e convivência maravilhosa, risadas e confidências.

Cá Oresco - Pititica, por ter me recebido e me ensinado muito, principalmente pela amizade e confiança.

Dul, Marcos e Mariana, pela convivência, momentos de aprendizado e descontração enfim, pela amizade.

Pessoal do laboratório: Camila, Babi, Nic, Anderson, Gu, Mano, Hέλvia, Dul, Άngela, Helό, Flά Leonardo, Marcos, Flά Pinho, Lena, Ucha, Andrэia, Carol, Renata, Letícia, Carla, Lύ Hollanda, Lύ Moreira, Tiago, Rosana, Adriana, Simones e Ana Flάvia, por todos os momentos e convivência agradável.

Raquel, Giseli, Vanessa e Rosana, por serem mais que amigas, por estarem sempre comigo, pela torcida, compreensão e apoio.

Enfim, a TODOS que estiveram presentes.

*“...Hoje me sinto mais forte mais feliz, quem sabe
Eu só levo a certeza de que muito pouco eu sei
Ou nada sei...”*

*...Cada um de nós compõe a sua história
E cada ser em si carrega o dom de ser capaz
E ser feliz...”*

Almir Sater – Tocando em Frente

	PÁG.
RESUMO	<i>xiv</i>
ABSTRACT	<i>xvii</i>
1- INTRODUÇÃO	19
1.1- Histórico	20
1.2- Anemia falciforme	21
1.3- Vaso-oclusão	24
1.4- Moléculas de adesão	28
1.5- Óxido nítrico (NO) e anemia falciforme	31
1.6- Hidróxiuréia	32
2- OBJETIVOS	34
2.1- Objetivos gerais	35
2.2- Objetivos específicos	35
3- CASUÍSTICA E MÉTODOS	36
3.1- Casuística	37
3.1.1- Pacientes e controles.....	37
3.2- Aspectos éticos da pesquisa	37
3.3- Contagem de células vermelhas no sangue periférico	38
3.4- Separação de células vermelhas	38
3.5- Tratamento com doadores de NO e outras drogas	38
3.6- Ensaio de adesão	38
3.7- Citometria de fluxo	40

3.8- Separação de reticulócitos.....	41
3.9- Extração de RNA.....	42
3.10- Síntese de DNA complementar (cDNA).....	42
3.11- Verificação da síntese de DNA complementar.....	43
3.12- Desenho dos primers.....	43
3.13- Padronizações para o PCR quantitativo em tempo real.....	44
3.13.1- Concentração de primer.....	44
3.13.2- Eficiência de reação.....	45
3.14- PCR quantitativo em tempo real.....	45
3.15- Análise dos dados do Real Time.....	49
3.16- Análise estatística.....	49
4- RESULTADOS.....	50
4.1- Características clínicas dos pacientes	51
4.2- Comparação da adesão basal de células vermelhas de controles e falciformes com e sem tratamento com HU.....	51
4.2.1- Padronização do método de adesão estático.....	51
4.2.2- Adesão de células vermelhas normais e falciformes com e sem tratamento com HU.....	53
4.2.3- Efeito do tratamento, <i>in vitro</i> , de células vermelhas com HU.....	55
4.2.4- Efeito do tratamento, <i>in vitro</i> , de células vermelhas com DEANO...	55
4.2.5- Efeito do tratamento, <i>in vitro</i> , de células vermelhas com SNP.....	58
4.2.6- Efeito do tratamento, <i>in vitro</i> , de células vermelhas com DBcGMP.....	58
4.3- Comparação da expressão protéica de CD49d, CD36 e CD71.....	61

4.4- Expressão gênica das moléculas de adesão em reticulócitos de pacientes falciformes com e sem terapia com HU.....	62
4.4.1- Integridade do RNA.....	62
4.4.2- Integridade do cDNA.....	62
4.4.3- Comparação da expressão gênica das moléculas de adesão em reticulócitos de pacientes falciformes com e sem terapia com HU.....	64
4.4.4- Comparação da expressão gênica das moléculas de adesão em reticulócitos de um paciente falciforme antes e depois da terapia com HU.....	66
5- DISCUSSÃO.....	69
6- CONCLUSÃO.....	74
7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	76
8- ANEXOS.....	87

LISTA DE ABREVIATURAS

AF	anemia falciforme
AMPc	adenosina monofosfato cíclico
BSA	soro albumina bovina
cDNA	DNA complementar
DEANO	Diethylamine NONOato
EDTA	ácido etilenodiaminotetracético
FN	fibronectina
GMPc	guanosina monofosfato cíclico
HbA	hemoglobina A
HbF	hemoglobina F
HbS	hemoglobina S
HU	hidroxiuréia
NO	óxido nítrico
pb	pares de bases
PBS	salina tamponada fosfatada
PCR	reação em cadeia da polimerase
RNA	ácido desoxirribonucléico
sGC	guanilato ciclase solúvel
SNP	Nitroprussiato de sódio
TNF	fator de necrose tumoral
VCAM	molécula de adesão vascular

	<i>PÁG.</i>
Tabela 1- Seqüência e tamanho dos fragmentos amplificados na técnica de PCR quantitativo em tempo real.....	44
Tabela 2- Concentração de primers utilizadas na técnica de PCR quantitativo em tempo real.....	45
Tabela 3- Detalhes clínicos dos pacientes com anemia falciforme que participaram do estudo.....	51
Tabela 4- Expressão protéica das moléculas estudadas por célula (MFI).....	61
Tabela 5- Porcentagem da população de células positivas (%) para as moléculas estudadas, em células de controles e falciformes com e sem terapia com HU.....	62

	PÁG.
Figura 1- Fisiopatologia da anemia falciforme.....	22
Figura 2- Mecanismo de vaso-oclusão.....	27
Figura 3- Moléculas de adesão celular.....	30
Figura 4- Curva padrão de adesão de células vermelhas.....	40
Figura 5- Eficiências de amplificação.....	46
Figura 6- Curva de amplificação do PCR quantitativo em tempo real.....	48
Figura 7- Curva de dissociação do PCR quantitativo em tempo real.....	48
Figura 8- Curva de tempo do ensaio de adesão estático.....	52
Figura 9- Adesão basal de células vermelhas.....	54
Figura 10- Adesão de células vermelhas tratadas com HU.....	56
Figura 11- Adesão de células vermelhas tratadas com DEANO.....	57
Figura 12- Adesão de células vermelhas tratadas com SNP.....	59
Figura 13- Adesão de células vermelhas tratadas com DBcGMP.....	60
Figura 14- Gel desnaturante de agarose com amostras de RNA.....	63
Figura 15- Gel de agarose com amplificação de β -actina.....	63
Figura 16- Expressão do gene CD36 em reticulócitos de pacientes SS com e sem terapia com HU.....	65
Figura 17- Expressão do gene CD49d em reticulócitos de pacientes SS com e sem terapia com HU.....	65

Figura 18-	Expressão do gene CD29 em reticulócitos de pacientes SS com e sem terapia com HU.....	66
Figura 19-	Expressão do gene CD36 em reticulócitos de um pacientes SS antes e após a terapia com HU.....	67
Figura 20-	Expressão do gene CD49d em reticulócitos de um pacientes SS antes e após a terapia com HU.....	67
Figura 21-	Expressão do gene CD29 em reticulócitos de um pacientes SS antes e após a terapia com HU.....	68

RESUMO



A anemia falciforme é um distúrbio genético da hemoglobina causado por uma mutação de ponto produzindo hemoglobina S (HbS) que quando desoxigenada causa, entre outros sintomas, eventos vaso-oclusivos. Um dos mecanismos indicados como causador da vaso-oclusão é a adesão de hemácias falciformes ao endotélio dos vasos. Eritrócitos falciformes e normais aderem ao endotélio vascular utilizando moléculas de adesão como, CD 36 e integrina VLA-4, entre outras moléculas de adesão. Hidroxiuréia (HU) é um agente quimioterápico que diminui a frequência de crises vaso-oclusivas, síndrome torácica aguda e necessidade de transfusão.

Longos tratamentos com HU levam a uma redução global das proteínas de superfície dos neutrófilos, monócitos e linfócitos, além de aumentar os níveis de Hemoglobina fetal (Hb F), que inibe a polimerização da célula falciforme desoxigenada. O NO é um importante vaso-dilatador responsável por inúmeros efeitos benéficos durante as crises vaso-oclusivas. Estudos demonstram que o NO pode diminuir a expressão endotelial de moléculas de adesão, mas estudos diretos sobre os níveis de expressão dessas moléculas em anemia falciforme na presença de NO não tem sido encontrados na literatura.

Deste modo objetivamos neste trabalho, analisar a expressão, gênica e protéica, e a função das moléculas de adesão VLA-4 (CD49d ou cadeia α e CD29 ou cadeia β) e CD 36 em células vermelhas de pacientes com anemia falciforme com e sem terapia com HU e os efeitos do tratamento *in vitro* com HU e agentes doadores de NO na adesão dessas células. Analisando a adesão das células vermelhas normais e de pacientes com e sem terapia com HU confirmamos que as células vermelhas de pacientes falciformes são mais aderentes que as células vermelhas normais e que a terapia com HU provoca uma diminuição dessa aderência. A citometria de fluxo comprovou a maior presença de células CD36⁺ e CD49d⁺ além de maior índice de expressão dessas moléculas nos pacientes falciformes em relação ao controle e a diminuição da expressão e positividade dessas moléculas em células de pacientes em terapia com HU quando comparadas com pacientes sem terapia. Adicionalmente, a análise por Real Time PCR demonstrou que a expressão gênica de CD36, CD49d e CD29 em reticulócitos falciformes é significativamente menor em pacientes em terapia com HU quando comparado com pacientes que não recebem essa terapia.

Em resumo, nossos resultados sugerem que: as propriedades adesivas à fibronectina (FN) são aumentadas em células SS e que estas propriedades diminuem nos pacientes que tomam a terapia de HU; a terapia com HU diminui a expressão protéica e a positividade, das células vermelhas falciformes, hemácias e células jovens, para os receptores CD36 e CD49d; e a expressão gênica das moléculas de adesão CD36 e CD49d em reticulócitos de pacientes com anemia falciforme que recebem terapia com HU é diminuída em relação ao grupo de pacientes falciformes que não recebem essa terapia.

ABSTRACT



Sickle cell vaso-occlusion constitutes a complex process involving interactions between SS red blood cells (RBC), endothelial cells, leukocytes, platelets, coagulative factors and plasma proteins. Propagation of the vaso-occlusive process in sickle cell anemia (SCA) is a complex process involving the adhesion of SS red cells and reticulocytes to the vascular endothelium. The effect of hydroxyurea therapy (HUT) on the adhesive properties of sickle red cells and the expression of adhesion molecule genes by erythroid cells of SCA individuals is not yet fully understood. The expressions of the CD36 gene and the VLA-4 integrin subunit genes, CD49d (α -subunit) and CD29 (β -subunit), were compared in the reticulocytes of steady-state SCA patients and patients on HUT using Real-Time PCR. Basal adhesion of red cells from these subjects was also compared using static adhesion assays, as was surface protein expression, using flow cytometry. Basal sickle red cell adhesion to fibronectin was significantly greater than that of normal cells ($P < 0.01$); in contrast, HUT significantly decreased ($P < 0.01$) red cell adhesion to levels similar to those of control cells and this decrease could not be justified solely by alterations in reticulocyte numbers in this population. Accordingly, flow cytometry demonstrated that HUT significantly decreased CD36 and CD49d surface expression ($P < 0.01$) and, importantly, significant reductions in the expressions of the CD36, CD49d and CD29 genes were seen ($P < 0.05$) in the reticulocytes of SCA patients on HU. Taken together, data support the hypothesis that HUT reduces the adhesive properties of sickle cells and that this decrease appears to be mediated, at least in part, by a decrease in the gene and, consequently, surface protein expression of adhesion molecules such as VLA-4 and CD36.

1- INTRODUÇÃO

1.1- Histórico da anemia falciforme

Herrick, em 1910, observou eritrócitos peculiarmente alongados e em forma de foice no sangue periférico de um estudante negro procedente da Jamaica, portador de um grave quadro anêmico, acompanhado de icterícia, complicações pulmonares e úlceras de membros inferiores.

Na literatura ocidental, os primeiros esforços para determinar as bases genéticas das células vermelhas falcizadas foram reportados por Emmel (1917) que sugeriu a hereditariedade depois de observar falcização em pai e filho. Taliaferro & Huck (1923), estudando uma grande população, concluiu que a falcização era uma característica dominante, sendo em algumas pessoas, responsável por anemia grave e em outras por uma falcização clinicamente assintomática. A distinção entre esses dois estados não foi esclarecida até 1949 quando Neel sugeriu primeiramente que a anemia falciforme era o estado homocigoto e o traço falciforme era o estado heterocigoto de um defeito genético indefinido.

Pauling e cols. (1949) mostraram que a hemoglobina S (HbS) era quimicamente diferente da hemoglobina normal, baseado em pontos isoelétricos diferentes e rápida migração eletroforética, demonstrando também que o traço falciforme continha hemoglobina A (HbA) e HbS, enquanto que a anemia falciforme continha apenas HbS.

Ingram (1956) demonstrou por análise de seqüências que a substituição do ácido glutâmico por uma valina na posição 6 da cadeia da β -globina eram as bases genéticas da HbS. Esse achado explicou, entre outras coisas, a diferença eletroforética entre as 2 globinas, e foi a primeira demonstração de uma substituição de amino ácido em proteína humana.

No Brasil a primeira referência a um paciente com anemia falciforme se deve a Castro, em 1933.

A anemia falciforme é originária da África e foi trazida pelos escravos para as Américas. Durante o começo do século XVI os escravos trazidos para o Brasil eram originados principalmente do Senegal e áreas próximas. Na metade do século XVII, os

principais portos de origens foram da África Ocidental (Benin) e no final do século, da costa onde os povos falavam a língua Bantu (Namíbia e Angola) (Steinberg et al., 2001).

Acredita-se que a contínua atividade miscigenatória tenha facilitado a propagação das hemoglobinas anormais, as estruturas do tipo HbS e HbC, de origem africana, são as detectadas com maior frequência no Brasil (Naoum, 1997).

O gene β^s apresenta distribuição heterogênea entre os diferentes estados brasileiros, variando de acordo com a região estudada. Em 1986, Ramalho descreveu a frequência de 6,6% de indivíduos heterozigotos para HbS na população negra do Estado de São Paulo, recentemente Brandelise e cols. (2004) descreveram a prevalência de 0,02% para a doença falciforme durante o programa de triagem neonatal.

Na região Nordeste, Bandeira e cols. (1999) encontraram a frequência de 0,2% para a doença falciforme no estado de Pernambuco; Araújo e cols. (2004) demonstraram 0,05% de portadores da Anemia falciforme em Natal e Rio Grande do Norte. Adorno e cols. (2005) descreveram a frequência de 0,2% de portadores de anemia falciforme em recém-nascidos de Salvador/BA.

1.2- Anemia falciforme

A anemia falciforme é um distúrbio genético das hemoglobinas causado por uma mutação de ponto envolvendo a substituição do nucleotídeo Adenina pela Timina (GAG→GTG), no códon 6 do gene da β -globina, no cromossomo 11, levando a substituição de um ácido glutâmico por uma valina, produzindo hemoglobina S (HbS) (Shiu, 2000; Serjeant & Serjeant, 2001, Steinberg et al., 2001).

A HbS, quando exposta a baixas tensões de oxigênio, forma polímeros, que são estruturas tubulares constituídas de 14 filamentos de HbS que se dispõem ao redor de um eixo central (Costa, 2004). A polimerização de HbS causa a deformação, enrijecimento e diminuição da flexibilidade das hemácias, resultando em anemia hemolítica, eventos vaso-oclusivos e asplenia funcional, causando aumento na susceptibilidade à infecção (Kasschau et al., 1996; Fadlon et al., 1998; Rosse et al., 2000). Os aspectos descritos podem ser observados na figura 1.

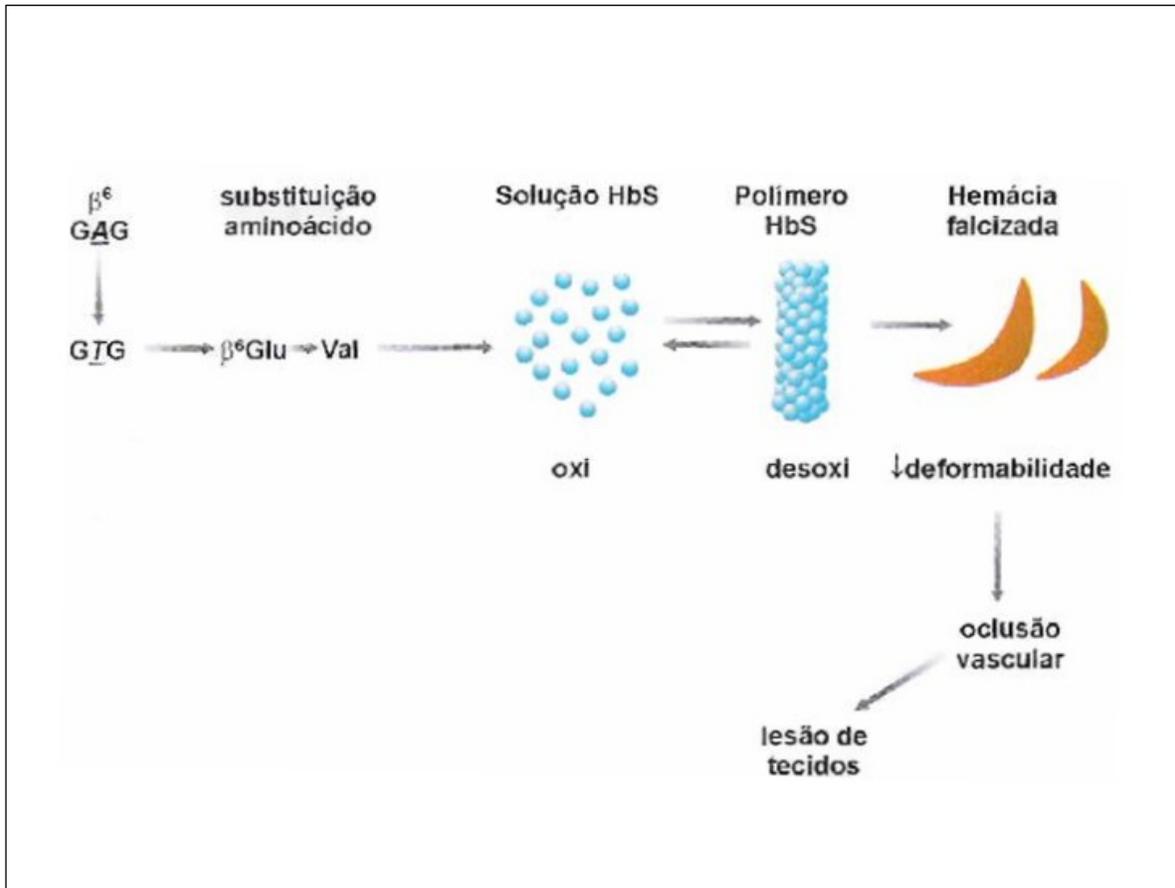


Figura 1- Fisiopatologia da anemia falciforme. A mutação gênica leva à formação de HbS que se polimeriza, causando modificações na hemácia e danos ao organismo. (Figura extraída de Costa in Zago, 2004).

A polimerização da HbS desoxigenada é o evento primário indispensável na patogênese molecular da anemia falciforme. Alguns dos fatores que influenciam a polimerização são: concentração de oxigênio, concentração de HbS, desidratação celular, presença de Hb normais, tempo de circulação dos glóbulos vermelhos na microcirculação, pressão, força iônica, pH e concentração intracelular de hemoglobina fetal (HbF) (De Franceschi & Corroche, 2004; Stuart & Nagel, 2004).

A hemoglobina fetal (HbF) é composta por duas cadeias alfa e duas cadeias gama, cuja interação com outros elementos da hemácia confere a essa hemoglobina maior afinidade pelo oxigênio do que a hemoglobina adulta ou hemoglobina A (HbA) (Ramalho, 1986). Em adultos, há resquícios da produção de hemoglobina F, correspondendo a menos de 1% do total de hemoglobina na maioria das pessoas normais. No entanto doenças que determinam um estresse da eritropoiése, em particular as anemias hemolíticas, tendem a manter os níveis de HbF ligeiramente mais elevados (Zago, 2004).

Os mecanismos que determinam os níveis de HbF em adultos não são totalmente conhecidos (Stoeckert et al., 1994). Estudos clínicos e epidemiológicos indicam que a concentração de HbF é um determinante da gravidade clínica da anemia falciforme. Indivíduos com baixos níveis de HbF possuem uma apresentação clínica mais grave, caracterizada por: crises de dor freqüentes, episódios de síndrome torácica aguda e maiores índices de mortalidade, do que os pacientes com altos níveis de HbF (De Franceschi & Corrocher, 2004).

Sendo assim, a anemia falciforme é caracterizada clinicamente por uma anemia hemolítica crônica e eventos vaso-oclusivos, que levam a crises de dor e lesão tecidual progressiva. A denominação, anemia falciforme, é utilizada para representar o estado homocigoto para a hemoglobina S (HbSS) (Schechter & Rodgers, 2000).

A gravidade da anemia falciforme é bastante variável, pacientes com anemia falciforme podem apresentar evoluções clínicas significativamente distintas. Três características geneticamente determinadas têm importância na gravidade da evolução clínica: os níveis de HbF, a concomitância de alfa talassemia e os haplótipos associados com ao gene da HbS (Costa in Zago, 2004).

Há cinco haplótipos diferentes associados ao gene da HbS: Senegal, Benin, Banto, Camarões e Árabe-indiano, sendo os haplótipos Senegal e Árabe-indiano associados com altos níveis de hemoglobina fetal e Benin e Banto com menores níveis de HbF. No Brasil, há a predominância dos haplótipos Banto e Benin que são relacionados com as formas mais graves da doença (Costa in Zago, 2004).

A concomitância com a alfa-talassemia tem como conseqüência a redução do volume corpuscular médio (VCM), menor número de reticulócitos e menor grau de hemólise, conferindo assim uma melhora clínica para os pacientes com anemia falciforme (Costa in Zago, 2004).

Estudos em humanos e modelos animais para anemia falciforme têm mostrado que os níveis aumentados de hemoglobina fetal diminuem significativamente a polimerização de hemoglobina S e falcização da hemácia. Indivíduos com baixas concentrações de HbF apresentam uma clínica mais grave quando comparados com indivíduos com altos níveis de HbF (De Francheschi & Corrocher, 2004).

1.3- Vaso-oclusão

Os fenômenos vaso-oclusivos acontecem principalmente em órgãos com circulação sinuosa, onde o fluxo de sangue é lento, a tensão do oxigênio é baixa ou ainda, naqueles órgãos onde há um suprimento sanguíneo arterial terminal limitado. A hipóxia decorrente da obstrução vascular leva a infartos teciduais, e proporciona crises de dor ou danos teciduais crônicos (Labbé & Elion, 1999).

Os eventos vaso-oclusivos são o resultado de um complexo cenário envolvendo interações entre diferentes tipos celulares, incluindo células falcizadas densas e desidratadas, reticulócitos, células endoteliais anormalmente ativadas, leucócitos, plaquetas e fatores do plasma (De Francheschi & Corrocher, 2004; Ballas et al., 1992).

Muitas evidências comprovam que leucócitos influenciam na manifestação clínica de anemia falciforme. Os leucócitos podem contribuir para a vaso-oclusão em anemia falciforme por aderirem ao endotélio vascular e hemácias. Neutrófilos de pacientes demonstram adesão aumentada para fibronectina e endotelina (Kasschau et al., 1996;

Fadlon et al., 1998). A contagem de neutrófilos sanguíneos tem uma relação direta com a severidade da doença e a leucocitose é associada com um alto relato de mortalidade (Platt et al., 1994; Anyaegbu et al., 1998, Manodori et al., 2000; Okpala et al., 2002). Adicionalmente, Canalli e cols (2004) demonstraram que os eosinófilos de pacientes com anemia falciforme são numericamente maiores e apresentam propriedades adesivas aumentadas.

O aumento dos números e ativação dos leucócitos são importantes mediadores da inflamação na anemia falciforme (Belcher et al., 2000; Lard et al., 1999). Células brancas sanguíneas podem aderir a outras células como, eritrócitos falcizados ou não, plaquetas e à parede do vaso sanguíneo, podendo ter um papel central no desenvolvimento da vaso-oclusão (Okpala, 2006).

Proteínas plasmáticas como a fibronectina, o fibrinogênio, fator de Von Willebrand e trombospondina, presentes em níveis elevados no plasma de pacientes com anemia falciforme também estão relacionados à indução da adesão das células falcizadas ao endotélio vascular (Kasschau et al., 1996).

Tem sido sugerido que o aumento da aderência das hemácias falciformes ao endotélio pode iniciar e propagar a vaso-oclusão, impedindo o fluxo sanguíneo e assim aumentando o tempo de passagem do sangue pelos capilares. A vaso-oclusão poderia ocorrer, pois o tempo do fluxo de hemácias pelos capilares seria maior do que o tempo necessário para desoxigenação induzindo assim a polimerização da hemoglobina S das hemácias falciformes (Rosse et al., 2000).

Desde os primeiros estudos *in vitro* Hoover e cols. (1979) e Hebbel e cols. (1980) demonstraram a aderência de células falciformes realizando cultura de células endoteliais. Essas reações de adesão são mediadas principalmente por interações entre receptores em eritrócitos e células endoteliais. Interações têm sido mostradas também entre células falciformes, componentes da matriz extracelular (Stuart, 2004) e leucócitos (Chiang, 2005).

Eritrócitos falciformes têm múltiplas interações adesivas, incluindo ligações ao endotélio, induzindo mudanças patológicas localizadas nas células endoteliais e/ou exposição da matriz subendotelial (Natarajan et al., 1996; Solovey et al., 1997). Essas

mudanças levam a eventos vaso-oclusivos secundários, possibilitando aos eritrócitos ligarem-se a esses novos componentes da matriz extracelular expostos (Hillery et al., 2000).

Alguns autores acreditam que a adesão seria na realidade uma consequência da saída prematura de células jovens da medula óssea, que ainda expressam proteínas que são usadas por elas na medula e normalmente não seriam mais encontradas na superfície de células vermelhas maduras circulantes (Sugihara et al., 1992; Browne & Hebbel, 1996; Elion et al., 2004). Ainda é possível que esses processos adesivos atuem de um modo cooperativo ou dependam diferencialmente de circunstâncias do território vascular. Desse modo, a vaso-oclusão na microcirculação parece resultar de dois mecanismos nos quais células vermelhas jovens, denominadas reticulócitos estressados, primeiro adiram fortemente a um endotélio ativado, reduzindo assim o fluxo sanguíneo e levando a ligações secundárias que causem o bloqueio das células vermelhas do sangue (Elion et al., 2004). A figura 2 apresenta um esquema da vaso-oclusão na anemia falciforme.

Além disso, tem sido mostrado que uma variedade de estímulos, incluindo epinefrina, pode ativar a adesão basal da molécula de adesão celular B-CAM/LU, um receptor de laminina em células vermelhas falciformes, através do nucleotídeo cíclico, AMPc, adenosina monofosfato cíclica, via proteína kinase A (PKA) (Hines et al., 2003).

Outros estudos demonstram ainda que, citocinas como o fator de necrose tumoral (TNF) α (Assis et al., 2005) e IL-1 α participam da regulação da expressão de moléculas de adesão de leucócitos pelas células do endotélio vascular. TNF α e IL-1 α estão elevados nos pacientes com anemia falciforme em períodos estáveis da doença (Lutty et al., 2001) e, embora esses níveis não sejam significativamente diferentes em pacientes em crise, os valores tendem a ser maiores (Francis & Haywood, 1992; Tavakolli et al., 2004).

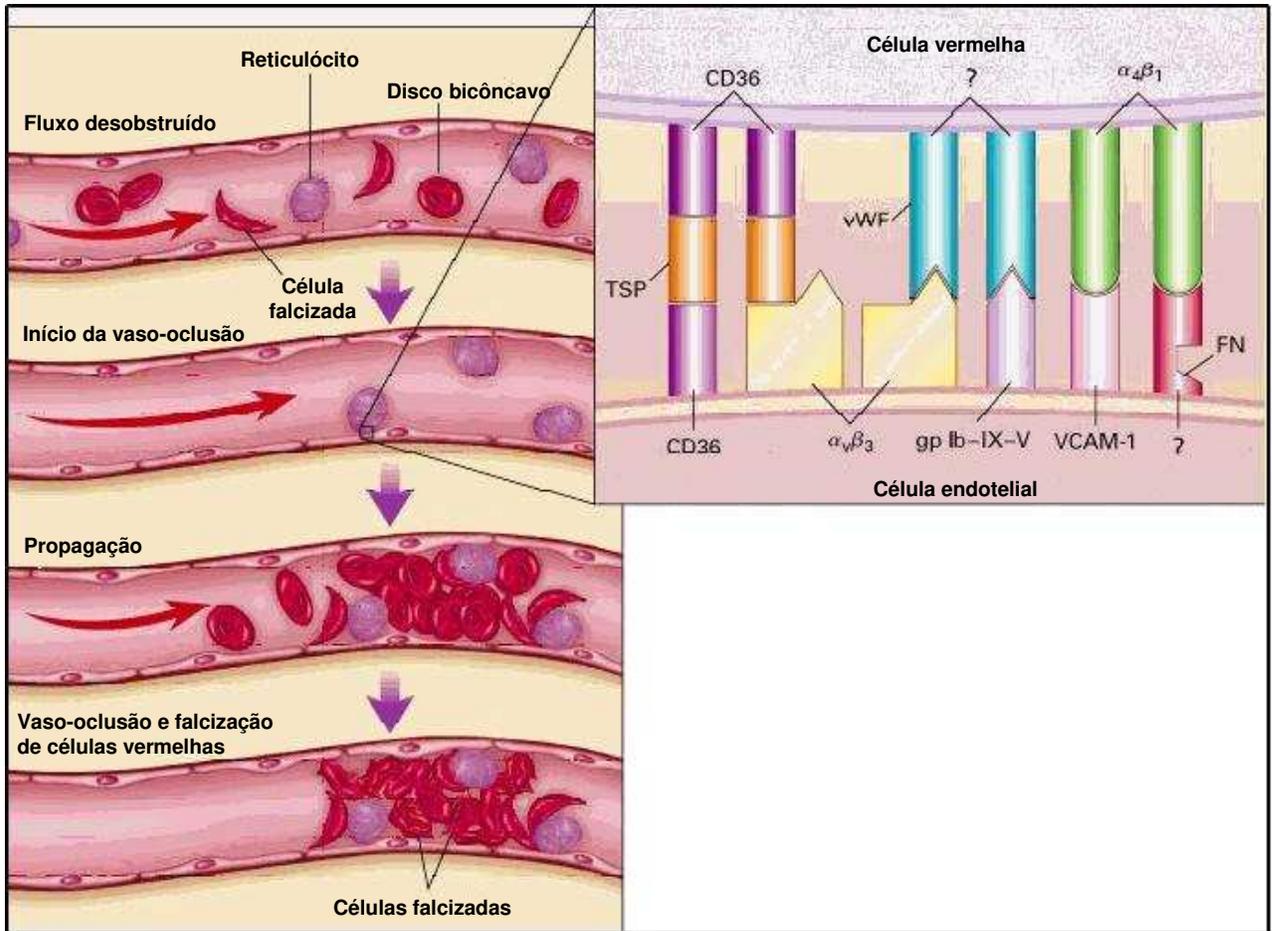


Figura 2- Mecanismo de vaso-ocusão. A participação de células vermelhas, interagindo com o endotélio vascular, diminuindo o fluxo sanguíneo até a obstrução total do vaso, em destaque estão apresentadas as moléculas de adesão celular que participam deste processo (Adaptado de Hebbel, 2000).

Apesar de tantos estudos, os mecanismos da vaso-oclusão não são ainda completamente conhecidos. Esta interação anormal célula-célula, utiliza vários mecanismos, muitos dos quais envolvem receptores de adesão que são expressos nas células vermelhas e endotélio dos vasos (Solovey, 2001).

1.4- Moléculas de adesão

Eritrócitos falciformes aderem ao endotélio vascular usando CD36 e integrina VLA-4 entre outras moléculas de adesão. Deste modo, eritrócitos podem contribuir para a vaso-oclusão na anemia falciforme via um processo ativo de adesão celular bastante distinto da obstrução mecânica passiva.

A VLA-4 é um membro da família das integrinas. As integrinas são proteínas de superfície celular, constituídas por duas cadeias polipeptídicas α e β , que atuam como mediadores do processo inflamatório, exercendo um papel importante nas etapas de adesão leucocitária, quimiotaxia, fagocitose, adesão endotelial e por fim agregação.

Integrinas são os principais receptores pelos quais as células prendem-se a matriz extracelular (Smyth et al., 1993). VLA-4 é expressa em linfócitos, monócitos e células progenitoras da linhagem eritróide, mas não em eritrócitos maduros (Roseblatt et al., 1991). Swerlick e cols.(1993) e Joneckis e cols.(1993) independentemente, demonstraram que VLA-4 é expressa em alto número de reticulócitos falciformes na circulação.

Moléculas ligantes para VLA-4 incluem VCAM-1 e fibronectina da matriz extracelular (Carlos et al., 1994). VCAM-1 é uma molécula de adesão vascular, sendo presente em níveis aumentados em pacientes com anemia falciforme (Styles et al., 1997). É expressa no endotélio vascular e está exposta à circulação de reticulócitos falciformes expressando VLA-4, providenciando, deste modo um mecanismo pelo qual células vermelhas falciformes podem aderir ao endotélio. A expressão de VCAM-1 no endotélio é regulada por citocinas como o fator de necrose tumoral (TNF) e interleucina-1 (IL-1) (Conforti et al., 1992). Reticulócitos falciformes demonstraram um aumento da aderência

às células endoteliais quando estas foram incubadas com TNF. Além disso, a incubação com anticorpos para VCAM-1 e α_4 integrinas (α -subunidade de VLA-4) foi capaz de inibir a aderência (Swerlick et al., 1993).

O CD36 é um receptor de adesão não pertencente à família das integrinas que liga com uma variedade de proteínas da matriz extracelular. Este receptor é mediador de adesão da integrina $\alpha_v\beta_3$ ao endotélio vascular via trombospondina (Conforti et al., 1992). A expressão de CD36 existente em células progenitoras da linhagem eritróide é perdida em células vermelhas maduras (Greenwalt et al., 1992; Okumura et al., 1992). Assim como VLA-4, o CD36 tem uma expressão anormal em reticulócitos falciformes circulantes. Acredita-se que CD36 e estas interações com trombospondina, são mecanismos potenciais pelos quais receptores de adesão podem contribuir para a vaso-oclusão na anemia falciforme (Styles et al., 1997).

Na figura 3 estão representadas algumas moléculas de adesão e suas interações entre células vermelhas e endotélio vascular.

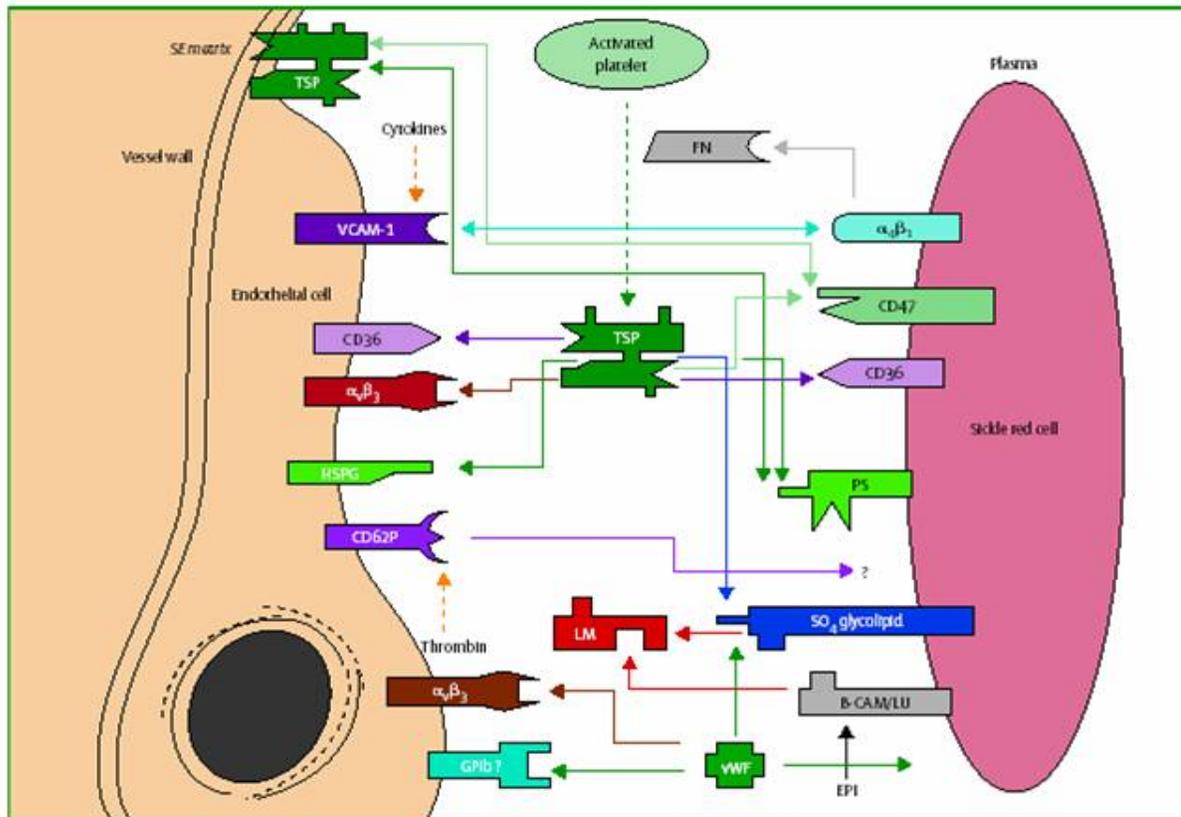


Figura 3- Moléculas de adesão celular presentes na superfície das células falciformes e células do endotélio vascular (Stuart, 2004).

1.5- Óxido nítrico (NO) e anemia falciforme

O óxido nítrico é um gás e um radical livre, que é agora conhecido por ter papéis fisiopatológicos importantes (Bruckdorfer, 2005). Referências têm sido feitas ao papel do NO em complicações agudas e crônicas na anemia falciforme. Esta molécula de sinalização, cujo precursor é a L-arginina, é continuamente produzida no endotélio pela NO sintase (Stuart, 2004). O NO é um importante vaso-dilatador responsável por inúmeros efeitos benéficos durante as crises vaso-oclusivas (Lopez et al., 2000).

O NO liberado pelo endotélio ativa a enzima guanilato ciclase solúvel nos músculos lisos, resultando no aumento intracelular de GMPc, guanosina monofosfato cíclica, (Ignarro et al., 1987). O GMPc ativa as vias de kinases dependentes em GMPc (PKG), diminuindo a concentração de cálcio intracelular nos músculos lisos, produzindo relaxamento, vasodilatação e aumento regional do fluxo sanguíneo (Mack et al., 2006). GCs, guanilato ciclase solúvel, é a enzima heterodímera que produz o GMPc e é formada por duas subunidades - alfa e beta. A subunidade alfa é associada com a expressão do gene da gama globina em células eritróides, bem como GMPc (Ikuta et al., 2001). GCs tem um grupo heme como grupo prostético para produzir GMPc, podendo assim serem induzidas por vários agentes, particularmente o NO (Denninger et al., 1999).

Gladwin e cols., (2001) sugeriram que uma deficiência na produção de NO pode acontecer nas células endoteliais de pacientes com anemia falciforme e têm sido relatadas reduções nos níveis dos Nox (metabólitos de NO, nitrito e nitrato) e L-arginina (substrato para produção de NO) nestes pacientes (Lopez et al., 1996, 2000). No entanto, novos estudos têm demonstrado que o NO é rapidamente consumido por um catabolismo acelerado do NO produzido, sugerindo que os três maiores mecanismos de diminuição da biodisponibilidade do NO são: redução dos níveis de L-arginina no plasma, interação com espécies reativas de oxigênio e finalmente, e de maior importância na anemia falciforme, o consumo do NO pela hemoglobina livre no plasma (Mack et al., 2006).

O que é claro, no entanto, é que o NO pode ter inúmeros efeitos benéficos durante as crises vaso-oclusivas (Lopez et al., 1996). Space e cols. (2000) demonstraram redução da expressão de VCAM-1 em cultura de células endoteliais de pacientes com

anemia falciforme, quando tratadas com doadores de NO, participando deste modo, da regulação da adesão de células vermelhas e brancas ao endotélio. Alguns autores têm postulado que a terapia com NO ou a suplementação de L-arginina poderia beneficiar os pacientes com anemia falciforme (Gladwin & Schechter, 2001; Morris et al., 2000).

1.6 Hidroxiuréia (HU)

Hidroxiuréia (HU) é um agente quimioterápico que diminui a frequência de crises vaso-oclusivas, síndrome torácica aguda e a necessidade de transfusão (Charache et al., 1995). Longos tratamentos com HU levam a uma redução global das proteínas de superfície dos neutrófilos, monócitos e linfócitos (Okpala, 2006) reduzindo também a contagem de neutrófilos. Evidências demonstram que os altos níveis de células brancas são um indicativo dos eventos adversos encontrados em pacientes com anemia falciforme (Castro et al., 1994).

A hidroxiuréia beneficia os pacientes com anemia falciforme por aumentar os níveis de Hemoglobina fetal (HbF), que inibe a polimerização da célula falciforme desoxigenada (Charache et al., 1995; 1996). Por esse motivo foi hipotetizado que a HU age como um agente intrínseco antifalcizante por aumentar os níveis de HbF (Hillery et al., 2000).

No entanto, a habilidade da HU em aumentar os níveis de HbF varia entre os pacientes. Muitos deles apresentam melhora clínica antes de apresentar aumento significativo dos níveis de HbF, sugerindo então que, a HU pode beneficiar pacientes por outros mecanismos que podem incluir: alterações nas células vermelhas e brancas, células endoteliais, mielossupressão, entre outras (Halsey et al., 2003; King, 2004).

O mecanismo pelo qual a HU induz o aumento de HbF e reduz a contagem de células brancas é mediado pela inativação de um radical tirosil em ribonuclease reductase (Lassmann et al., 1992; Yarbrow et al., 1992), um efeito que poderia ser mediado por NO (Knon et al., 1991; Lepoivre et al., 1994) e nitrovasodilatadores (Bundy et al., 1999).

Rodriguez e cols. (1998), relataram que a farmacodinâmica da hidroxiuréia possibilita que ela seja uma doadora de NO e também uma estimuladora da produção de NO. Morris e cols. (2001), sugeriram que a hidroxiuréia pode ser oxidada pelo grupo heme e produzir radicais livres de moléculas de NO in vitro. Gladwin e cols. (2002) afirmam que a terapia com hidroxiuréia promove a geração intravascular e intraeritrocítica de NO. Esse aumento de NO produzido torna-se o responsável por aumentar os níveis de HbF. Cokic et al. (2003) mostrou recentemente que dois outros doadores de NO, aumentam a expressão do gene da gama globina em progenitores eritróides e isto está associado ao aumento dos níveis de GMPC, sugerindo a presença de uma via mediada por NO na indução do gene da γ -globina, com conseqüente aumento na síntese de HbF.

Estudos demonstram que o NO pode diminuir a expressão endotelial de VCAM-1 em células falciformes (Stuart e Setty, 1999). Recentemente, Covas e cols. (2004) demonstraram por citometria de fluxo, a diminuição da expressão de moléculas de adesão CD36, CD49d e CD71, um marcador de ferritina, em eritrócitos falciformes durante tratamento com HU. Mas estudos diretos sobre os níveis de expressão de moléculas de adesão em anemia falciforme na presença de NO não tem sido encontrados na literatura.

A nossa hipótese é que a terapia com HU pode provocar uma diminuição na função das moléculas de adesão, diminuindo assim as propriedades adesivas das células, além de atuar modificando a expressão gênica e protéica de moléculas como VLA-4 e CD36. Os efeitos benéficos da HU podem ser mediados por uma via dependente de NO e deste modo, torna-se interessante o estudo dos efeitos dos doadores de NO nas propriedades adesivas de células falciformes.

2- OBJETIVOS

2.1- Objetivos gerais

Analisar a expressão e função das moléculas de adesão VLA-4 e CD36 em células vermelhas de pacientes com anemia falciforme e sua modulação, em níveis gênicos, protéicos e funcionais, na terapia com HU e na presença de HU e agentes doadores de NO.

2.2- Objetivos específicos

1. Avaliação do estado funcional das moléculas de adesão das células vermelhas de indivíduos controles e de pacientes falciformes com e sem terapia com HU, utilizando ensaio de adesão *in vitro*;
2. Avaliação do estado funcional das moléculas de adesão das células vermelhas de pacientes falciformes e controles, tratadas e não tratadas, *in vitro*, com HU, doadores de NO e um análogo de GMPc, por ensaio de adesão *in vitro*;
3. Avaliação da expressão das moléculas de adesão VLA-4 cadeia α (CD49d) e CD36 na superfície das células vermelhas normais e de pacientes falciformes com e sem terapia com HU, através de citometria de fluxo;
4. Avaliação da expressão gênica das moléculas de adesão VLA-4 e CD36 em reticulócitos de pacientes com anemia falciforme com e sem terapia com HU, através de Real Time PCR.

3- CASUÍSTICA E MÉTODOS

3.1- Casuística

3.1.1- Pacientes e controles

Foram selecionados pacientes com anemia falciforme homocigota (SS) diagnosticada pelo Hemocentro da UNICAMP, utilizando os métodos de eletroforese de hemoglobina e cromatografia líquida de alta pressão (HPLC) (VARIANTTM; Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA).

Foram coletados 4ml de amostra de sangue periférico de 40 pacientes com anemia falciforme. Os pacientes com idade entre 18-50 anos, estavam em fase estável, na ausência de infecção ou processos inflamatórios e sem transfusão prévia por pelo menos 3 meses. Para os pacientes que fizeram parte do grupo de estudo com terapia de HU, esse tratamento deveria consistir de uma dosagem de 20-30 mg/kg/dia por pelo menos 3 meses. Caracterização dos pacientes, na Tabela 3 em resultados.

Amostras de sangue periférico de 30 indivíduos saudáveis foram usadas como controles, grupo composto de doadores voluntários de sangue do Hemocentro da Unicamp, com idade entre 18-50 anos, não sendo heterocigoto para HbS.

Os indivíduos (pacientes e controles) assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido.

3.2- Aspectos éticos da pesquisa

Este estudo foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP – CEP em 09/12/2003 e homologado na I Reunião ordinária, em 20/01/2004 (registro CEP: 613/2003). Foi aprovado pela Comissão Nacional em Pesquisa – CONEP em 27/08/2004 (Registro CONEP: 9716; processo nº. 25000.011952/2004), segundo as atribuições do Conselho Nacional de Saúde.

O Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) que foi assinado por todos os participantes desse estudo, também foi aprovado pelos conselhos citados.

3.3- Contagem de células vermelhas e reticulócitos no sangue periférico

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

3.4- Separação de células vermelhas

Amostras de sangue periférico foram coletadas em tubo com citrato de sódio e centrifugadas por 10 minutos a 500g para remoção do plasma e buffy coat. As células foram lavadas 3 vezes sendo ressuspensas em PBS (Salina fosfatada tamponada) e centrifugadas a 700g, 600g e 480g respectivamente, sendo então, ressuspensas com 1 mL de PBS para contagem de células vermelhas no contador automático Cell-Dyn 1700(ABBOT, IL, USA). A concentração final foi ajustada para 4×10^8 cel/mL.

3.5- Tratamento com doadores de NO e outras drogas

O tratamento das células vermelhas foi realizado utilizando-se SNP (Sigma Chem. Co.; St Louis, USA), DEANO (Diethylamine NONOate; Cayman Chemical), Hidroxiuréia (HU; Sigma Chem. Co., St Louis, USA) e Dibutiril cGMP (DBcGMP, Sigma Chem. Co.; St Louis, USA) que é um análogo de GMPc, segundo mensageiro principal do NO. Para o tratamento com SNP foram utilizadas as seguintes dosagens: 0,01, 0,1 e 1 mM. Para a HU e DEANO as dosagens de 0,1, 1, 10, 100 e 250 μ M. E para DBcGMP foram utilizadas as dosagens de 0,01 e 0,1 mM.

3.6- Ensaio de adesão

Placas com 96 poços de fundo plano foram preparados por *coating* individual com 60 μ L de fibronectina (20 μ g/mL de FN em PBS; GiBCO™; Invitrogen Corporation) *overnight* à 4°C. Os poços da placa foram lavados três vezes com 100 μ L de PBS. Os sítios inespecíficos foram bloqueados com 150 μ L de PBS/BSA a 1% por 90 minutos à 37°C. Os

poços foram lavados novamente por mais três vezes com 100 µL de PBS. Depois de secos, adicionamos em 3 poços na placa, um volume de 50 µL da solução celular contendo 2×10^8 cel/mL células vermelhas para a adesão basal e células vermelhas tratadas em concentração de 2×10^8 cel/mL, com os componentes estudados, em meio Hank's Balanced Salt Solution (HBSS; GIBCO BRL, Life Technologies).

A incubação foi realizada por um tempo de 30 minutos, que foi estabelecido como tempo ideal para que as células respondam aos estímulos causados pelos componentes estudados, à 37°C, 5% CO₂ e 5% de O₂. Após a incubação, os poços foram lavados gentilmente por três vezes com 100 µL de PBS, para que as células não aderentes fossem desprezadas. Por fim colocamos 50 µL de meio HBSS em cada poço, para evitar que as células aderidas sofressem desidratação.

Para mensurar a quantidade de células vermelhas que aderem à FN, realizamos uma curva padrão. Para construir a curva, adicionamos, em duplicata, concentrações em porcentagem de 0, 5, 8, 10, 20, 50, 80 e 100% da suspensão original de células (2×10^8 células/mL), onde o 0% é formado apenas de meio HBSS e o 100% apenas de solução original de células. Uma curva padrão típica, de um controle e um paciente, de experimentos realizados estão representadas na Figura 4.

A solução de revelação utilizada no ensaio de adesão é a solução de DRABKIN (Sigma Chem. Co., St Louis, USA), que é um reagente muito utilizado na rotina hematológica, contendo cianeto e ferrocianeto de potássio. Esse reagente tem a propriedade de lisar as células vermelhas e expor a hemoglobina presente nessas células. Após isso há a oxidação da hemoglobina e metahemoglobina em cianometahemoglobina. A intensidade de cor desse composto se mede colorimetricamente, permitindo assim a leitura em comprimento de onda de 540nm.

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

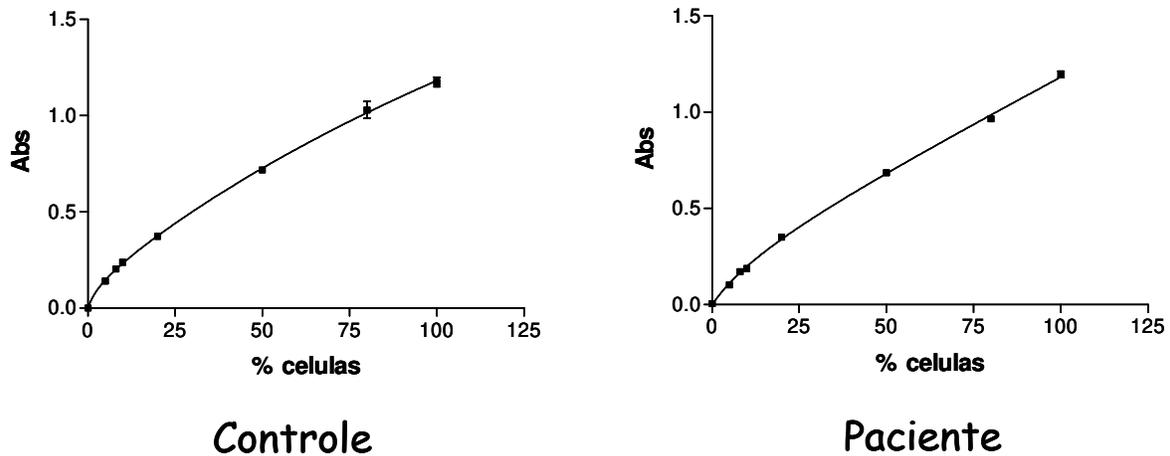


Figura 4- Curva padrão da adesão de células vermelhas de um experimento realizado. As concentrações da curva consistem em diluições da solução de células a 2×10^8 células/ml em porcentagem de 0 a 100%.

3.7- Citometria de fluxo

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

A expressão das moléculas de adesão na superfície das células vermelhas de pacientes com anemia falciforme foi detectada através da citometria de fluxo. Para marcação de antígenos de superfície celular, 5 μ L de sangue total coletado em tubo com EDTA foram ressuspensos em 95 μ L de PBS e incubados com 3 μ L de anti-VLA-4 subunidade α , CD 49d, clone 44H6, (SEROTEC; Oxford, UK) ou 2 μ L de anti CD 36, clone CLB-IVC7, (SANQUIN; Amsterdam, Netherlands), conjugados ao FITC. Também foi utilizado, 3 μ l de um anticorpo anti-receptor de transferrina – CD 71, clone T56/14 (CALTAG, Burlingam) conjugado com FITC, que é um marcador de reticulócitos, para

assim verificarmos a expressão das moléculas de adesão em células maduras e imaturas. Essa solução de células com anticorpos foi incubada por 30 min, 4°C, na ausência de luz.

Às células devidamente marcadas foram adicionados 500 µL de PBS e centrifugadas a 1000rpm por 5 minutos, sendo o sobrenadante desprezado e o pellet ressuspenso em 2 mL de PBS e conservadas a 4°C, ao abrigo da luz, até a hora da aquisição no citometro.

As células foram analisadas a 488 nm em um FACScalibur Becton-Dickinson. SSC/FSC (*side scatter/forward scatter*) dot plots foram usados para identificar a população de células vermelhas. A intensidade da fluorescência de cada célula foi então comparada com as células incubadas com um controle de isotipo (IgG1, SEROTEC; Oxford, UK) conjugado com FITC e PE.

3.8- Separação de reticulócitos

A separação de reticulócitos foi realizada como descrito pelo protocolo do “The New York Blood Center”. Amostras de sangue periférico (4 mL) foram coletadas em tubo com EDTA e centrifugadas por 10 minutos à 1.700g para remoção do plasma e buffy coat. Às células restantes foi adicionado cinco vezes o volume de uma solução de lise (5 volumes de 0.144 M NH₄Cl e 0.5 volumes de 0.011 M NH₄HCO₃), sendo mantidas em gelo, com agitação a cada 5 minutos, por 30 minutos, e centrifugado a 1.700g por 10 minutos. O sobrenadante foi transferido para outro tubo e foi adicionado 0.1 volume de solução de 1.5 M sucrose-KCl e centrifugado a 4.800g por 20 minutos. O sobrenadante foi transferido para um tubo limpo e 700 µL de 10% de ácido acético foi adicionado e centrifugado a 4.800g por 20 minutos para precipitação dos reticulócitos. O sobrenadante foi desprezado e ao pellet foi adicionado cerca de 1 mL (1 mL para cada 5x10⁶ células) de TRIzol (Gibco-BRL, Gaithersburg, MD), que rompe as células, dissolvendo os componentes celulares sem comprometer a integridade do RNA.

3.9- Extração de RNA

Para obtenção do RNA de reticulócitos utilizamos o método de extração com o reagente TRIzol (Gibco-BRL, Gaithersburg, MD) de acordo com as instruções do fabricante. A amostra contendo reticulócitos e TRIzol foi incubada por 5 minutos a temperatura ambiente, a fim de que houvesse completa dissociação dos complexos núcleo-protéicos, 200 μ L de clorofórmio (CHCl_3) foi adicionado e agitado vigorosamente sendo realizada nova incubação por 5 minutos a temperatura ambiente. Após centrifugação por 15 minutos a 19.000g em temperatura de 4°C, o sobrenadante foi retirado e acondicionado em outro tubo, procedendo imediatamente para a etapa de precipitação com 500 μ L de isopropanol gelado. Após homogeneização, foi realizado nova incubação por 10 minutos em temperatura ambiente seguida de centrifugação por 10 minutos a 19.000g à 4°C. O sobrenadante foi desprezado e ao precipitado adicionamos 800 μ L de etanol gelado a 70%, sendo realizada nova centrifugação por 5 minutos a 14.000g à 4°C. Finalmente, o sobrenadante foi desprezado e o precipitado de RNA colocado para secar por 10 minutos a temperatura ambiente, sendo então ressuspensionado em água estéril contendo dietilpicrocarbonato (DEPC) e incubado a 55°C por 10 minutos e posteriormente colocado em gelo para solubilização total do RNA.

A integridade da amostra foi verificada por eletroforese em gel desnaturante de agarose à 1,2%. As amostras com qualidade adequada de RNA apresentavam íntegras as duas subunidades ribossomais: 18S e 28S. Após a eletroforese, as amostras de RNA foram armazenadas em freezer -80°C.

3.10- Síntese de DNA complementar (cDNA).

As amostras de RNA obtidas, foram submetidas à síntese de DNA complementar (cDNA) utilizando-se o kit Superscript III RTTM (Invitrogen, Life Technologies). Após leitura em espectrofotômetro (Gene Quant-Pharmacia, USA) e quantificação, 3 μ g de RNA foram tratados com a enzima DNase I (Invitrogen, Life Technologies), para remoção de DNA contaminante. Foi adicionado 1,0 μ L de 1 u/ μ L

DNase I, 1,0 µL de 10x DNase I *Reaction Buffer* (200 mM Tris-HCl, 20 mM MgCl₂, 500 mM KCl) e água suficiente para um volume final de 10,0 µL de reação. A reação foi realizada por 15 minutos a temperatura ambiente e paralisada com 1,0 µL de 25 mM EDTA, e incubado por 10 minutos a 65°C.

Para a síntese do cDNA adicionou-se a seguir 1,0 µL de 50 µM oligo(dT)₂₀ e 1,0 µL de 10 mM dNTP's. As amostras foram incubadas por 5 minutos a 65°C, seguidos por 1 minuto a 4°C. A cada amostra adicionamos 10,0 µL da seguinte mistura de reação: 2 µL de 10x RT *buffer*, 4,0 µL de 25 mM MgCl₂, 2,0 µL de 0,1 M DTT, 1,0 µL de 40 U/µL RNase OUT™ e 1,0 µL de 200 U/µL Superscript III RT™. A reação ocorreu por 50 minutos a 50°C, seguido de 5 minutos a 85°C. A seguir, foi adicionado 1,0 µL de 2 U/µL *E. coli* RNase H por 20 minutos a 37°C.

3.11- Verificação da síntese de DNA complementar

A verificação da síntese de cDNA foi feita por meio de PCR para amplificação do gene da beta-actina (BAC). Realizamos as reações com: 5,0 µL de 10x PCR *buffer* (20 mM Tris-HCl, 500 mM KCl), 1,5 µL de 50 mM MgCl₂, 1,0 µL de 10 mM dNTP's, 1,0 µL de 10 mM de *primer* BACF (5'- AAGAGATGGCCACGGCTGCT – 3'), 1,0 µL de 10 mM de *primer* BACR (5'- TCGCTCCAACCGACTGCTGT – 3'), 0,5 µL de Taq DNA *polimerase*, 1,0 µL de cDNA e 39 µL de água, para um volume final de 50 µL. O programa foi iniciado por 2 minutos à 94°C, seguido de 35 ciclos: 94°C/ 30 segundos – 58°C/ 45 segundos – 72°C/ 40 segundos, sendo finalizado por 72°C/ 7 minutos. Os produtos foram submetidos à eletroforese em gel de agarose à 1% para verificação da ampliação de 640pb.

3.12- Desenho dos *Primers* para a reação do PCR quantitativo em tempo real

Os *primers* utilizados nas reações do PCR Quantitativo em Tempo Real, foram desenhados com o uso do site www.invitrogen.com e com o software “Primer Express” (Applied Biosystems), analisados no programa *Blast* (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast) para verificação das condições de formação de estruturas como *hairpins* e *dimers*. Os *primers* utilizados neste estudo estão listados na tabela 1.

3.13- Padronizações necessárias para o PCR quantitativo em tempo real

3.13.1- Concentração de *Primer*

A concentração ótima de *primer* a ser utilizada na PCR quantitativa em tempo real, deve ser mínima o suficiente para permitir a duplicação de todas as cópias do gene presentes na amostra. Utilizando a mesma quantidade de amostra, foram feitas reações contendo cada um dos *primers* (sense e anti-sense) na concentração final de 150nM, 300nM, 600nM e 900nM. O ciclo no qual se detecta fluorescência acima do limite basal estabelecido (*threshold*) é denominado ciclo de *threshold* ou Ct. Considerando que se utilizou a mesma quantidade de amostra em todas as reações, o Ct não deveria variar. Se o aumento da concentração de *primer* ocasionou diminuição de Ct, então a quantidade deste reagente na reação ainda era insuficiente. Assim, a concentração ótima escolhida foi a mínima, associada ao menor Ct. Na Tabela 2 estão listadas as concentrações dos *primers* utilizados na amplificação dos genes de estudo e eficiência de amplificação obtida.

Tabela 1- Seqüência e tamanho dos fragmentos amplificados de cada par de primer utilizado na amplificação dos genes estudados na técnica de PCR quantitativo em tempo real.

Gene	Seqüência Primer	Tamanho do fragmento amplificado
CD 36 - F	5'- AAACCTCCTTGGCCTGATAG - 3'	61 pb
CD 36 - R	5'- AGCAACAAACATCACCACAC - 3'	
CD 49d - F	5'- TTCCTACGGGCTGTGTTC - 3'	85 pb
CD 49d - R	5'- CTGAAGTTTGCCAGTTTGG - 3'	
CD 29 - F	5'- TCCAACCTGATCCTGTGTC - 3'	82 pb
CD 29 - R	5'- TCGTTGTTCCCATTCCTG - 3'	
β - actina - F	5'- AGGCCAACC GCGAGAAG - 3'	79 pb
β - actina - R	5'-ACAGCCTGGATAGCAACGTACA- 3'	
GAPDH - F	5'- GCACCGTCAAGGCTGAGAAC - 3'	89 pb
GAPDH - R	5'- CCACTTGATTTTGGAGGGATCT - 3'	

Tabela 2- Concentração de primers utilizadas na amplificação dos genes de estudo e eficiência de amplificação obtida. As concentrações foram definidas pela eficiência de amplificação gerada nas condições testadas.

Primer	Concentração utilizada	Eficiência do primer
CD 36	150nM	99,4%
CD 49d	600nM	99,78%
CD 29	300nM	100%
β – actina	150nM	100%
GAPDH	300nM	100%

3.13.2- Eficiência de Reação

Para que a reação de PCR em tempo real seja confiável e reprodutivas são necessárias condições ótimas de reação, ou seja, que as amplificações apresentem 100% de eficiência de amplificação a cada ciclo, ocorrendo duplicação da amostra. A eficiência de amplificação é obtida da fórmula $10^{(-1/slope)}$, onde *slope* significa o valor da inclinação da curva (Meijerink *et al*, 2001).

A otimização acontece utilizando a concentração ótima de *primer* com 7 quantidades conhecidas de amostra, em escala logarítmica: 2ng (2×10^0), 6,32ng ($2 \times 10^{0,5}$), 20ng (2×10^1), 63,2ng ($2 \times 10^{1,5}$), 120ng, 200ng (2×10^2) e 632ng ($2 \times 10^{2,5}$). Os resultados são utilizados para construção de uma curva padrão Ct *versus* quantidade de amostra. Na figura 5 estão demonstradas as curvas de eficiência para os *primers* utilizados neste estudo.

3.14- PCR quantitativo em tempo real – “Real Time PCR”

Após leitura em espectrofotômetro (Gene Quant-Pharmacia, USA) e quantificação, alíquotas de cDNA foram utilizadas como molde em reações de PCR quantitativa em tempo real. A técnica consiste no monitoramento óptico da fluorescência

emitida durante a reação de PCR (Higuchi et al., 1993), através da ligação de uma sonda específica ou um corante, na fita recém sintetizada.

As reações, feitas sempre em duplicata, foram realizadas utilizando o reagente SYBERGreen PCR Master Mix® (Applied Biosystems), que além de conter todos os reagentes necessários para PCR (dNTP's, MgCL₂, tampão, Taq Ampli-Gold), contém o corante SYBERGreen, componente intercalante de dupla fita necessário para a detecção da reação ciclo a ciclo. Além disso, utiliza-se amostras de cDNA e *primers* específicos para o gene analisado.

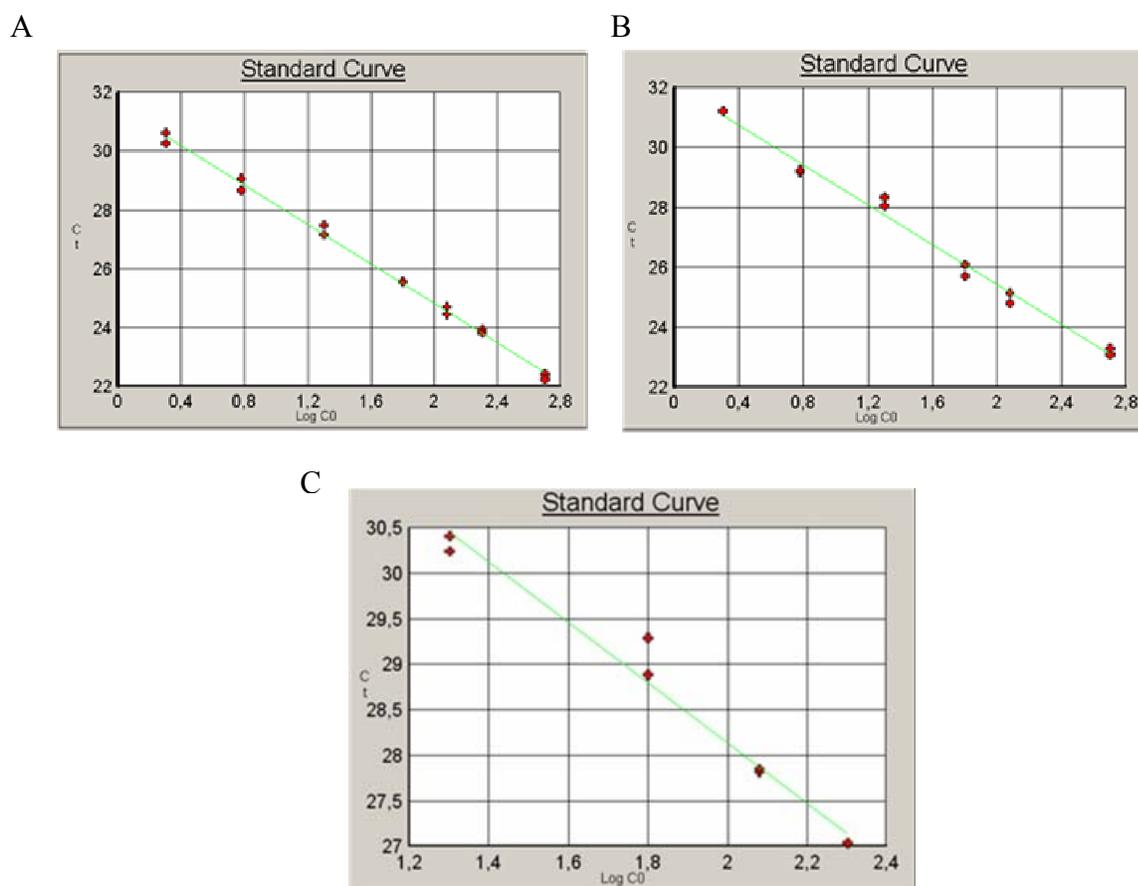


Figura 5- Análise das eficiências de amplificação dos *primers* utilizados. (A) CD 36; (B) CD 49d e (C) CD 29.

A detecção de amplificação em tempo real foi realizada no equipamento ABI 5700 Sequence Detector System® (Applied Biosystems) em gráficos de fluorescência *versus* número de ciclos. Quanto maior a expressão de um gene, ou seja, quanto mais cópias existirem no início da reação, mais precocemente ocorre a amplificação e, consequentemente, menor é o Ct. Na figura 6 há a demonstração de uma curva de amplificação do PCR em tempo real.

As reações realizadas continham 12,5 µL do reagente SYBERGreen PCR Master Mix®, 25 ng de amostra de cDNA e a concentração ótima de *primer* determinada, perfazendo um volume final de 25 µL. Em todos os casos foram feitos controles negativos, contendo água estéril em substituição à amostra. As reações foram preparadas em placas de 96 poços (Sorenson, BioScience Inc) com tampas plásticas que permitem a passagem de luz. O programa foi iniciado por 95°C/ 10 minutos, seguido de 45 ciclos: 95°C/ 15 segundos – 60°C/ 1 minuto. Ao final de uma amplificação normal adiciona-se um passo de degradação durante o qual a temperatura aumenta gradualmente de 60°C para 95°C. À medida que os produtos gerados por PCR desnaturam com o aumento da temperatura, cai o sinal fluorescente do SYBR Green. O gráfico resultante permite verificar se há um ou mais produtos de PCR presentes em cada reação, devido a diferenças de TM (*melting temperature*) entre os produtos de PCR amplificados, essa diferença é causada pelo número e composição de bases de cada produto (Figura 7).

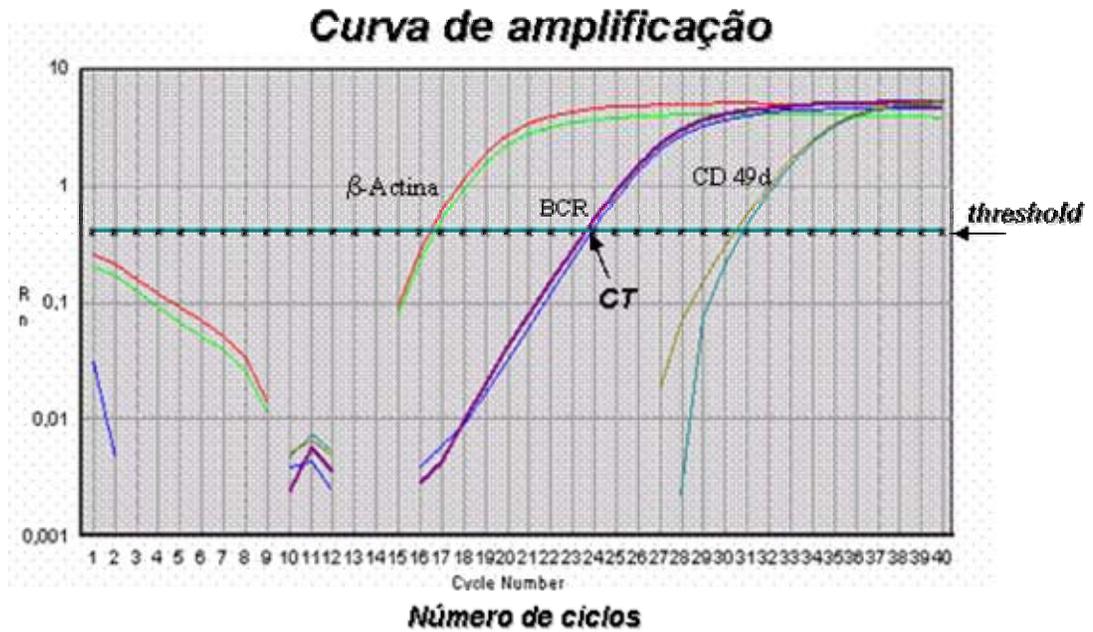


Figura 6- Curva de amplificação do PCR quantitativo em tempo real. Demonstrando as curvas de amplificação da β -actina, BCR e CD49d.

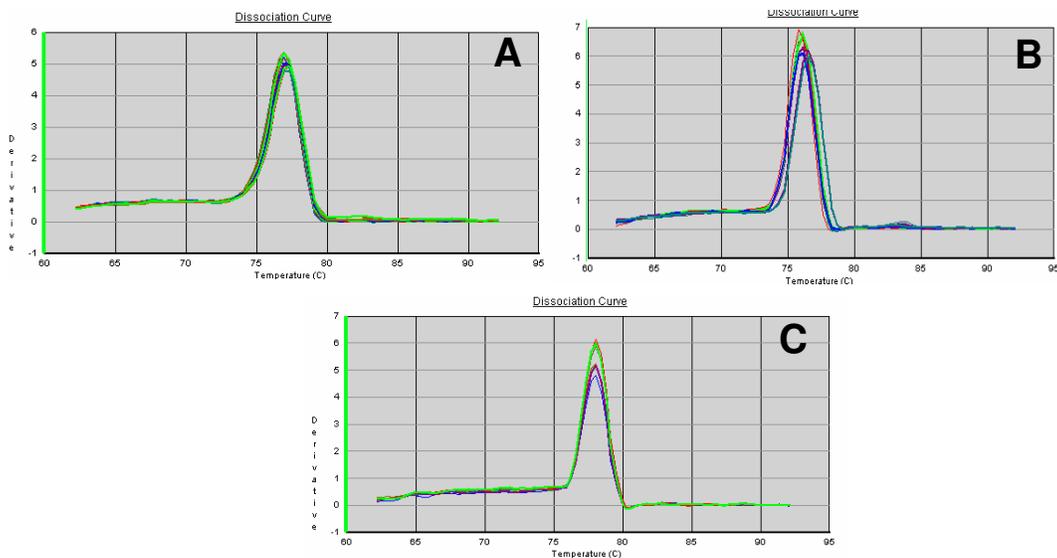


Figura 7- Curva de dissociação, utilizada para analisar a ausência de contaminantes. Em (A) CD36, (B) CD49d, e em (C) CD29.

3.15- Análise dos dados do real time

A expressão dos genes de interesse foram determinadas de uma forma relativa, sendo normalizadas com relação a genes chamados calibradores, neste estudo foram utilizados a β -actina e o GAPDH, que são genes cuja expressão é dita constitutiva, ou seja, apresentam pouca variação entre diversas condições. No entanto, alguns trabalhos vêm demonstrando que a expressão desses genes pode variar consideravelmente (Vandesompele, 2002).

Dos valores de Ct obtidos, foi calculada média aritmética das duplicatas do Ct. A seguir foi obtida a quantidade de expressão (Q), por meio da fórmula $Q = E^{\text{deltaCt}}$, onde E = eficiência de reação e delta Ct = menor Ct observado – Ct da amostra. Desta forma a expressão foi relacionada à amostra que apresentou maior expressão (Menor Ct observado), que recebeu valor $Q = 1$. Os valores de Q dos genes calibradores de cada amostra foram submetidos ao programa *Gnorm* (Vandesompele, 2002), que calcula a média geométrica entre eles, valor este denominado Fator de Normalização da amostra. A expressão normalizada de um dado gene de interesse em uma determinada amostra é dada pela razão entre o valor Q do gene de interesse da amostra e Fator de Normalização da amostra. O dado obtido é expresso em unidades arbitrárias ou valor absoluto de expressão.

3.16- Análise estatística

Os resultados estão expressos como média +/- erro padrão da média (EPM) e os dados de cada grupo foram comparados utilizando o teste de Mann-Whitney com uma significância estabelecida de ($p < 0,05$). O teste T pareado ($p < 0,05$) foi utilizado para comparar grupos específicos. Todos os cálculos foram realizados utilizando-se o programa GraphPad InStat.

4- RESULTADOS

4.1- Características hematológicas dos pacientes

Tabela 3- Detalhes clínicos dos pacientes com anemia falciforme que participaram do estudo. Os valores estão expressos como média, menor valor, mediana e maior valor.

	SS	SS+HU
Homem/Mulher	9/ 19	8/6
Idade	32.0 (30, 19, 48)	31.9 (29, 20, 53)
Células vermelhas. (x 10 ⁶ µL)	2.68 (2.60, 1.71,4.03)	2.34 (2.54, 1.70, 3.56)
Hematócrito (%)	24.2 (24.1, 17.9, 33.1)	27.5 (27.1, 18.5, 36.2)
Hemoglobina (g/dL)	8.1 (7.8, 5.8, 11.2)	9.28 (9.1, 6.7, 12.3)
Volume corpuscular médio (fL)	93.2 (94.8, 70.4, 116.1)	104.5 (103.1, 87.4, 122.8)
Hemoglobina corpuscular média(µL)	31.47 (32.5, 21.0, 39.2)	34.4 (35.2, 28.1, 41.0)
HbF (%)	7.2 (6.2, 1.8, 16.5)	15.8 (15.5, 5.8, 22.5)
Reticulócitos (x 10 ³ /µL)	401.9 (403.8,164.6, 710.8)	311.7 (217.2, 130.9, 670.0)

SS: Pacientes com anemia falciforme

SS+HU: Pacientes com anemia falciforme em terapia com HU

4.2- Comparação da adesão basal de células vermelhas controles e falciformes com e sem tratamento com HU

4.2.1- Padronização do método de adesão estático

Escolha do ligante e concentração do ligante

O ligante FN foi escolhido para este ensaio, pois esta é uma das moléculas ligantes para VLA-4, molécula alvo desse estudo. A concentração utilizada foi acertada em experimentos prévios realizados com hemácias, baseado em um protocolo estabelecido para ensaio de adesão de leucócitos.

Padronização de tempo

A incubação das células no ensaio de adesão de células vermelhas ocorre em 30 minutos que foi estabelecido como tempo ideal para que as células respondessem aos estímulos causados pelos componentes estudados. Para se estabelecer este tempo foi realizado uma curva de tempo para células vermelhas falciformes e células vermelhas controles. Foi adicionado uma solução de células de 2×10^8 cél/ml, e a adesão à FN observada nos tempos de 0, 15, 30, 45, 60, 75 e 90 minutos, à 37°C, 5% CO₂. Após a incubação as células não aderidas foram gentilmente removidas e a porcentagem de células aderidas foi calculada pela comparação com a curva padrão realizada, Figura 8.

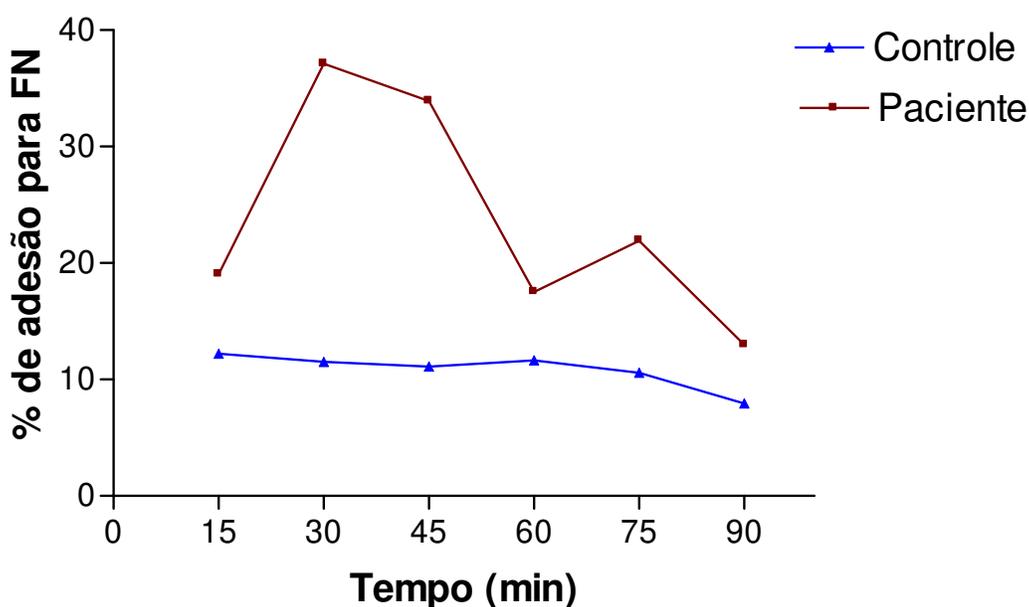


Figura 8- Curva realizada para determinação do tempo de incubação adotado no ensaio de adesão de células vermelhas (2×10^8 céls/mL) à FN (20 μ g/mL). Curva representativa de três experimentos realizados.

4.2.2- Adesão de células vermelhas normais, falciformes com e sem tratamento com HU

Experimentos realizados (Figura 9), com o ensaio de adesão estática, para medir os níveis basais de adesão de células vermelhas de indivíduos normais (AA) e células vermelhas de pacientes falciformes com e sem terapia com HU, demonstraram que as células falciformes (SS) aderem significativamente mais à FN do que as células normais ($5,86 \pm 1,05$; $15,38 \pm 2,75$; $5,78 \pm 0,60$, respectivamente; $p = 0,0079$), e que há uma diferença significativa entre as células falciformes de pacientes que recebem tratamento com HU (SS+HU) e as células de pacientes que não recebem essa medicação ($p = 0,0056$).

A população de reticulócitos nas células vermelhas dos indivíduos falciformes (SS) foi ligeiramente, mas não significativamente maior ($370,9 \pm 42,3 \times 10^6$ cels/ml) do que a população de reticulócitos nas células vermelhas do grupo falciforme em terapia com HU ($288,2 \pm 60,2 \times 10^6$ céls/ml), portanto a diminuição da adesão celular do grupo de pacientes que toma HU não pode ser completamente explicada pelo aumento da idade da população celular. Deste modo, realizamos experimentos para verificar os níveis de adesão basal de células vermelhas de um grupo de pacientes com esferocitose hereditária (EH) ($360,2 \pm 119,6 \times 10^6$ céls/ml) com número de reticulócitos similares aos dos pacientes com anemia falciforme no qual não foi encontrado aumento significativo das propriedades adesivas. No entanto, embora os níveis de adesão basal das células vermelhas do grupo de pacientes com terapia de HU sejam próximos aos níveis de adesão encontrados nas células vermelhas normais a porcentagem de reticulócitos foi significativamente maior do que no controle ($288,2 \pm 60,2$; $50,9 \pm 7,7$, respectivamente; $p < 0,001$). Portanto, o aumento nas propriedades adesivas das células vermelhas dos pacientes falciformes não parece estar diretamente relacionado ao número de reticulócitos na população celular.

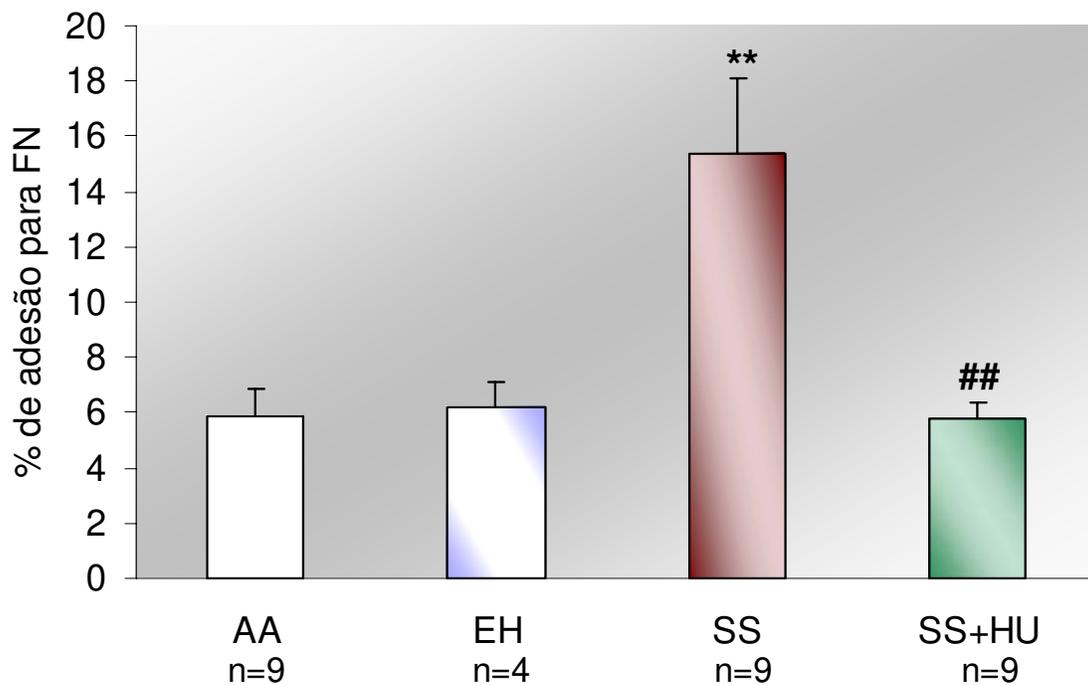


Figura 9- Adesão basal de células vermelhas normais (AA), células vermelhas de pacientes com (SSHU) e sem tratamento (SS) de HU e células vermelhas de pacientes com Esferocitose Hereditária (EH). Valores representados por média \pm EPM. ** $p < 0,01$, SS comparado com AA; ##, $p < 0,01$ comparado com SS. Teste Mann-Whitney.

4.2.3- Efeito do tratamento, *in vitro*, de células vermelhas com HU

Células vermelhas normais e de pacientes com anemia falciforme foram tratadas *in vitro* com HU. Células vermelhas à 2×10^8 cél/ml foram tratadas e incubadas na presença de 0,1, 1,0, 10,0, 100,0 e 250,0 μ M de HU. Figura 10.

Nossos resultados indicam que o tratamento com HU, *in vitro*, sob nossas condições experimentais, não afeta significativamente ($p > 0,05$) a adesão das células vermelhas falciformes e das células vermelhas normais para FN.

4.2.4- Efeito do tratamento, *in vitro*, de células vermelhas com DEANO

Células vermelhas normais e de pacientes com anemia falciforme foram tratadas *in vitro* com diferentes concentrações de DEANO.

As células vermelhas (2×10^8 cels/mL) de pacientes falciformes e controles foram tratadas com DEANO nas concentrações de 0,1, 1,0, 10,0, 100,0 e 250,0 μ M. Nossos resultados indicam que o tratamento com DEANO *in vitro* não afetou significativamente a adesão, das células vermelhas falciformes e das células vermelhas normais para FN, esses resultados estão demonstrados na figura 11.

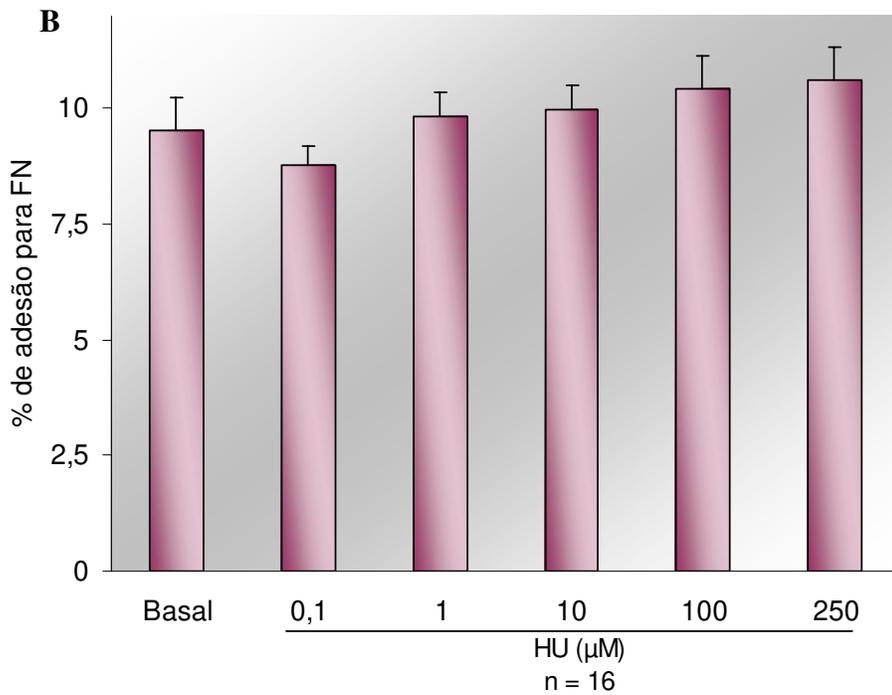
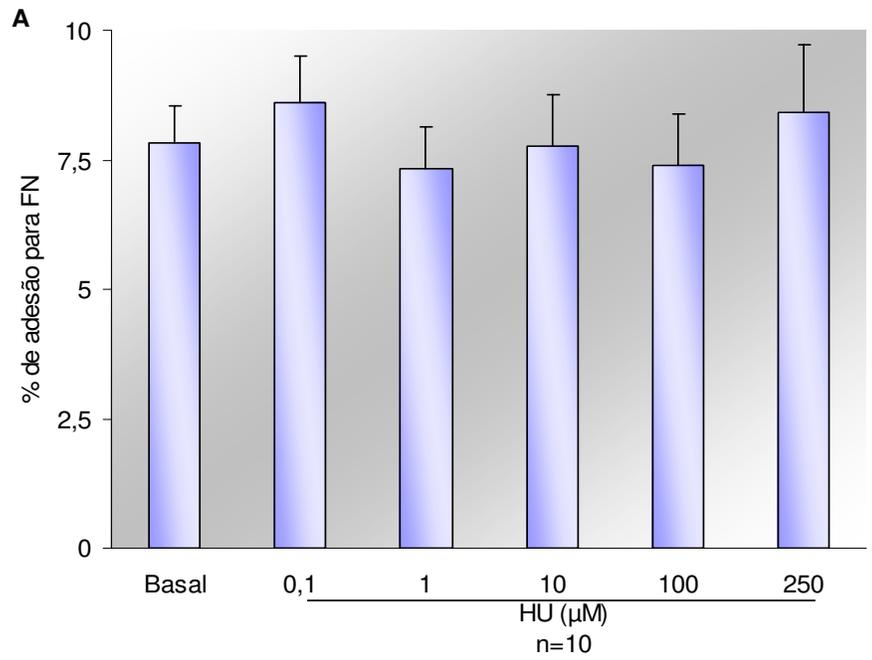


Figura 10- Adesão para FN (20 µg/ml) de células vermelhas (2×10^8 cels/ml) tratadas com HU, incubadas por 30 min a 37°C, 5 % CO₂ e 5% de O₂. Em A: aderência de células normais, e em B aderência de células vermelhas falciformes. Valores demonstrados como média ± EPM. Teste T pareado.

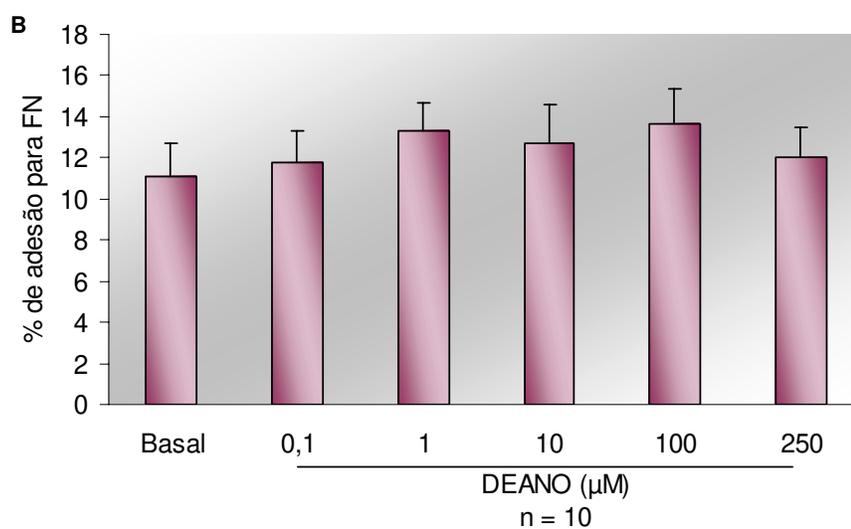
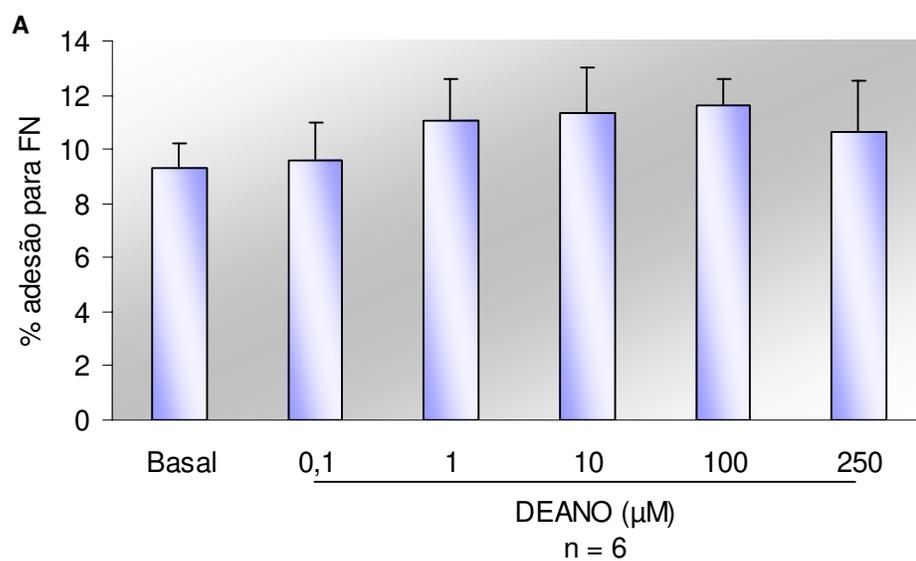


Figura 11- Adesão para FN (20 $\mu\text{g/ml}$) de células vermelhas (2×10^8 cels/ml) tratadas com DEANO, incubadas por 30 min a 37°C , 5 % CO_2 e 5% de O_2 . Em A: aderência de células normais, e em B aderência de células vermelhas falciformes. Valores representados por média \pm EPM. Teste T pareado.

4.2.5- Efeito do tratamento, *in vitro*, de células vermelhas com SNP

Células vermelhas normais e de pacientes com anemia falciforme foram tratadas *in vitro* com diferentes concentrações de SNP (Nitroprussiato de Sódio).

As células vermelhas falciformes e controles foram tratadas com SNP nas concentrações de 0,01, 0,1 e 1,0 mM. Nossos resultados indicam que o tratamento com SNP *in vitro* não afetou significativamente a adesão, das células vermelhas falciformes e das células vermelhas normais para FN, sob nossas condições experimentais, esses resultados estão demonstrados na figura 12.

4.2.6- Efeito do tratamento, *in vitro*, de células vermelhas com DBcGMP

Foi realizado o tratamento de células vermelhas normais e de pacientes com anemia falciforme com duas concentrações de DBcGMP, um análogo de GMPC, que é o segundo mensageiro principal do NO.

As células vermelhas falciformes e controles foram tratadas *in vitro* com DBcGMP nas concentrações de 0,01 e 0,1 mM. Os resultados indicaram um aumento significativo da adesão das células normais na concentração de 0,1 mM de DBcGMP ($5,86 \pm 1,05$; $7,23 \pm 1,3$; $p = 0,04$). Nas células falciformes houve um aumento significativo da adesão na concentração de 0,01 mM ($12,74 \pm 3,08$; $18,74 \pm 4,6$; $p = 0,014$), Teste T pareado. Os resultados obtidos estão demonstrados nos gráficos A e B da figura 13.

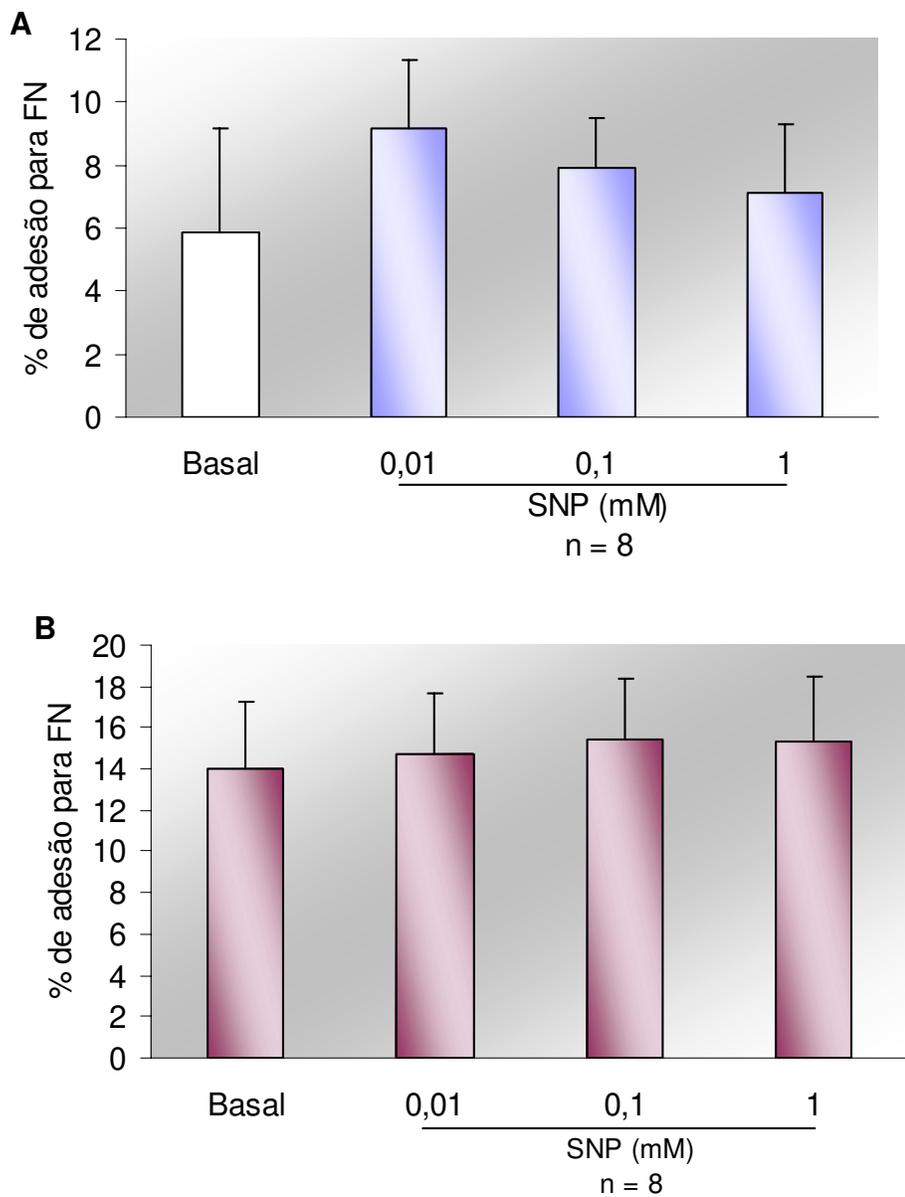


Figura 12- Adesão à FN (20 $\mu\text{g/ml}$) de células vermelhas (2×10^8 cels/ml) tratadas com SNP, incubadas por 30 min a 37°C , 5 % CO_2 e 5% de O_2 . Em A: aderência de células normais, e em B aderência de células vermelhas falciformes. Valores representados por média \pm EPM. Teste T pareado.

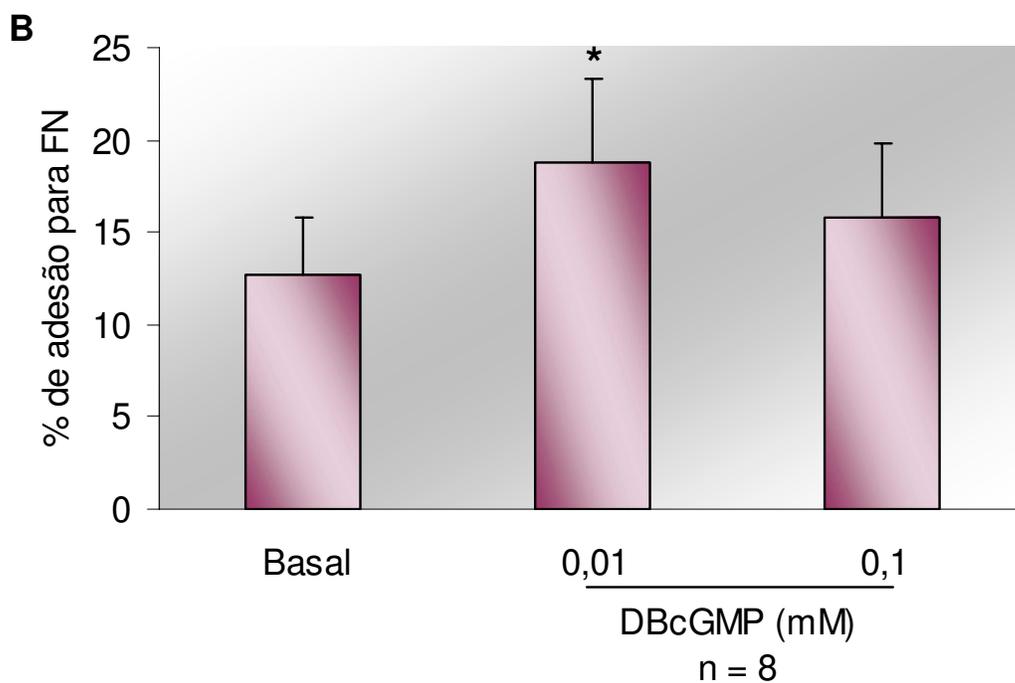
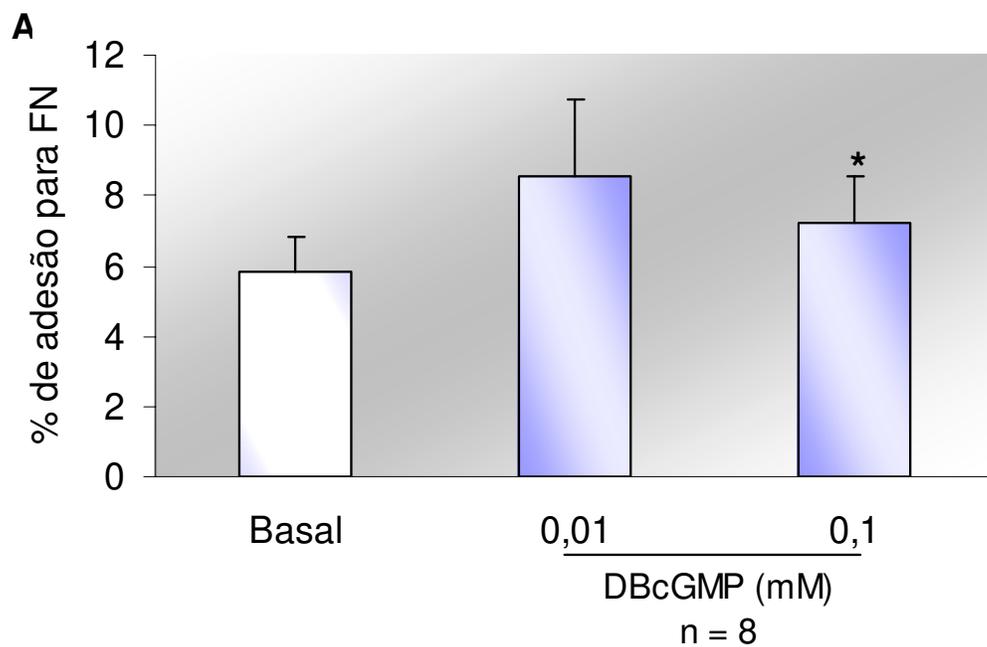


Figura 13- Adesão à FN (20 $\mu\text{g/ml}$) de células vermelhas (2×10^8 cels/ml) tratadas com DBcGMP, incubadas por 30 min a 37°C , 5 % CO_2 e 5% de O_2 . Em A: aderência de células normais, e em B aderência de células vermelhas falciformes. Valores representados por média \pm EPM. * $p < 0,05$, Teste T pareado.

4.3- Comparação da expressão protéica de CD49d, CD36 e CD71

A expressão das moléculas de adesão estudada por citometria de fluxo foi determinada por dois parâmetros: a intensidade de fluorescência por célula (MFI), que corresponde a quantidade de expressão da molécula por célula; e a porcentagem de células positivas para os receptores, medida que é expressa em porcentagem.

Na tabela 4 estão apresentados, os valores da média e os erros padrões da intensidade de fluorescência por célula (MFI), para os marcadores usados em nossos experimentos. E na tabela 5 estão apresentados, o valor da média e os erros padrões da porcentagem de células positivas para os marcadores utilizados.

Nossos resultados demonstram que células vermelhas de pacientes falciformes apresentam um aumento da positividade e expressão, das moléculas estudadas, em relação às células vermelhas normais. A terapia com HU diminui a expressão e positividade das células quando comparadas com as células dos pacientes que não possuem terapia com HU.

Tabela 4- Expressão de subunidades de moléculas de adesão na superfície de células vermelhas de indivíduo controle e falciformes com e sem tratamento. Os resultados representam a expressão de moléculas por célula (MFI). Os valores estão expressos como média e erro padrão da média. A estatística foi realizada utilizando-se o teste Mann-Whitney.

	AA	SS	SS+HU
	MFI	MFI	MFI
	Média ± EPM	Média ± EPM	Média ± EPM
CD36	12,21 ± 2,04	92,25 ± 15,22	37,56 ± 6,52
CD49d	6,70 ± 0,65	16,69 ± 0,88	9,18 ± 0,88
CD71	7,59 ± 0,68	171,21 ± 69,0	38,49 ± 15,91
	n = 7	n = 10	n = 6

* p < 0,05; ** p < 0,01 comparado com AA; # , p < 0.05 comparado com o grupo SS.

Tabela 5- Porcentagem da população de células positivas (%) para as moléculas estudadas, em células vermelhas de indivíduo controle e falciformes com e sem tratamento. Os valores estão expressos como média e erro padrão da média. A estatística foi realizada utilizando-se o teste Mann-Whitney.

	AA	SS	SS+HU
	%	%	%
	Média ± EPM	Média ± EPM	Média ± EPM
		**	** #
CD36	3,29 ± 1,00	18,61 ± 2,77	9,56 ± 1,6
		**	* #
CD49d	2,84 ± 0,94	13,31 ± 1,7	6,88 ± 0,85
		**	**
CD71	3,64 ± 1,04	18,23 ± 3,23	11,52 ± 2,57
	n = 7	n = 10	n = 6

* p < 0,05; ** p < 0,01 comparado com o controle; # p < 0,05, comparado com o grupo SS.

4.4- Expressão gênica das moléculas de adesão em reticulócitos de pacientes falciformes com e sem terapia com HU

4.4.1- Integridade do RNA

Todas as amostras apresentaram integridade de material conforme figura 14.

4.4.2- Integridade do cDNA

Após confirmação da integridade do RNA, foi realizada a transcrição reversa e todas as amostras apresentaram integridade conforme figura 15.

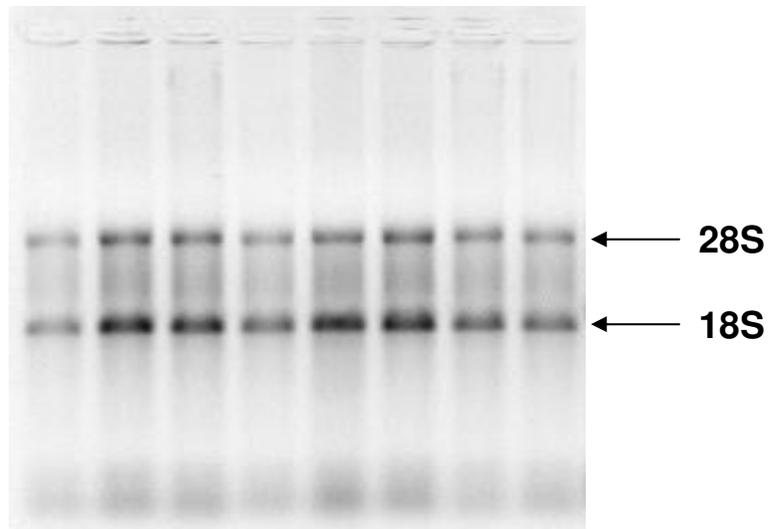


Figura 14- Gel desnaturante de agarose à 1,2%, com amostras de RNA de reticulócitos de pacientes com anemia falciforme, onde pode-se ver as subunidades 28S e 18S do RNA ribossomal. A visualização das subunidades permitem a confirmação de integridade do material.

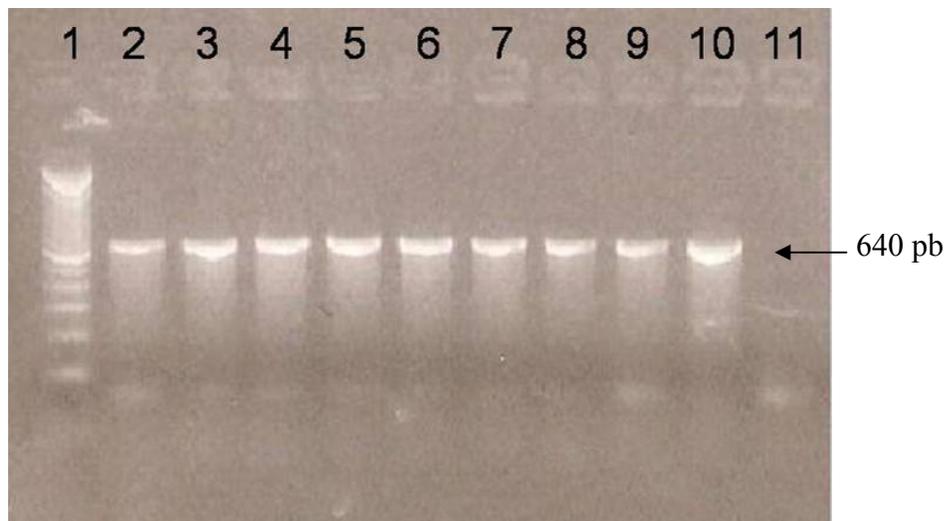


Figura 15- Gel de agarose a 1,5%, com amplificação de β – actina. Na coluna 1, marcador de peso molecular 100 pb; colunas 2 a 10 amostras de cDNA de reticulócitos de pacientes com anemia falciforme e coluna 11 controle negativo da reação.

4.4.3- Comparação da expressão gênica das moléculas de adesão em reticulócitos de pacientes falciformes com e sem terapia com HU

Alguns experimentos foram realizados utilizando amostras de reticulócitos de pacientes com anemia falciforme (SS) e de pacientes com anemia falciforme tratados com hidroxiuréia (SS+HU). Esses resultados demonstram a diminuição da expressão dos genes das moléculas de adesão estudadas.

Comparando a expressão gênica das moléculas de adesão CD36, a expressão foi significativamente menor nos reticulócitos de pacientes em terapia com HU do que nos reticulócitos de pacientes sem tratamento ($1,33 \pm 0,29$; $0,50 \pm 0,17$, respectivamente; $p = 0,04$). Similarmente, a expressão das unidades α e β da integrina VLA-4 (CD49d e CD29, respectivamente) também foram significativamente menores em reticulócitos de pacientes com terapia de HU, do que nos reticulócitos de pacientes sem terapia (CD49d: $2,88 \pm 0,72$; $1,03 \pm 0,4$; $p = 0,016$ e CD29: $2,11 \pm 0,68$; $0,62 \pm 0,19$; $p = 0,02$).

Os valores de Ct obtidos foram normalizados de acordo com a quantidade de β -actina e GAPDH de cada amostra.

Resultados demonstrados nas figuras 16, 17 e 18.

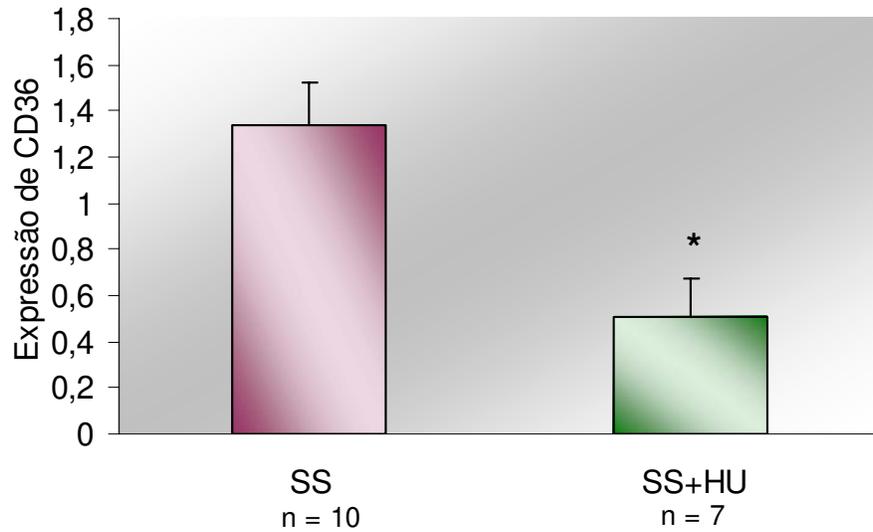


Figura 16- Expressão do gene CD36 em reticulócitos de pacientes SS com e sem terapia com HU. Valores representados por média \pm EPM. * $p < 0,05$. Teste Mann-Whitney.

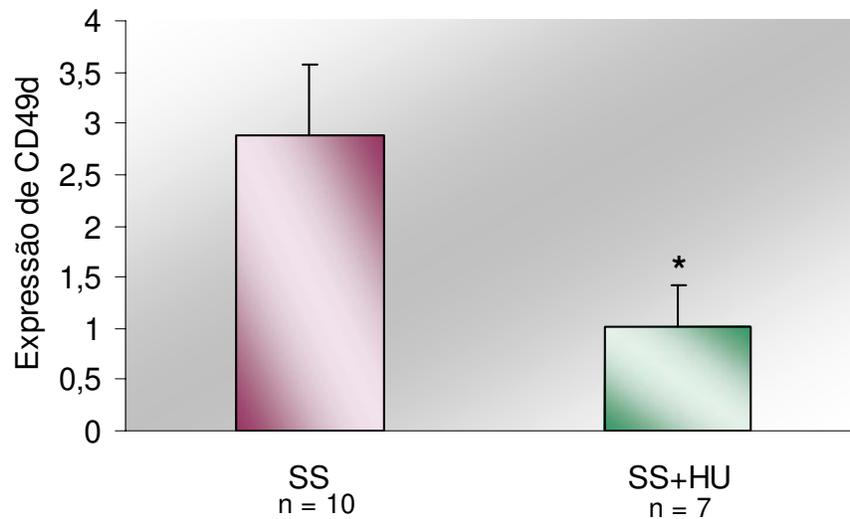


Figura 17- Expressão do gene CD49d (subunidade $\alpha 4$ de VLA-4) em reticulócitos de pacientes SS com e sem terapia com HU. Valores representados por média \pm EPM. * $p < 0,05$. Teste Mann-Whitney

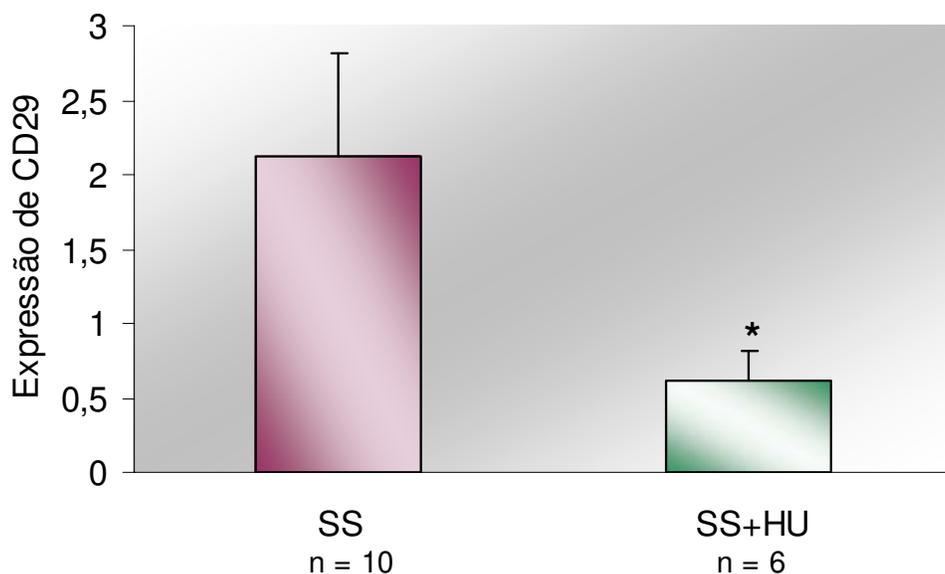


Figura 18- Expressão do gene CD29 (subunidade β 1 de VLA-4) em reticulócitos de pacientes SS com e sem HU. Valores representados por média \pm EPM. * $p < 0,05$. Teste Mann-Witney.

4.4.4- Comparação da expressão gênica das moléculas de adesão em reticulócitos de um paciente falciforme antes e depois da terapia com HU

Foi realizado experimento utilizando amostra de reticulócito de um mesmo paciente antes e depois de 10 meses de terapia com HU. Comparando a expressão gênica das moléculas de adesão CD36, a expressão foi significativamente menor ($p = 0,0001$) nos reticulócitos do paciente quando em terapia com HU do que nos reticulócitos deste paciente antes do tratamento. Assim como, a expressão das unidades α e β da integrina VLA-4 (CD49d e CD29, respectivamente) também foram significativamente menores nos reticulócitos do paciente em terapia de HU ($p = 0,0001$, $p = 0,04$, respectivamente). Dados demonstrados nas figuras 19, 20 e 21.

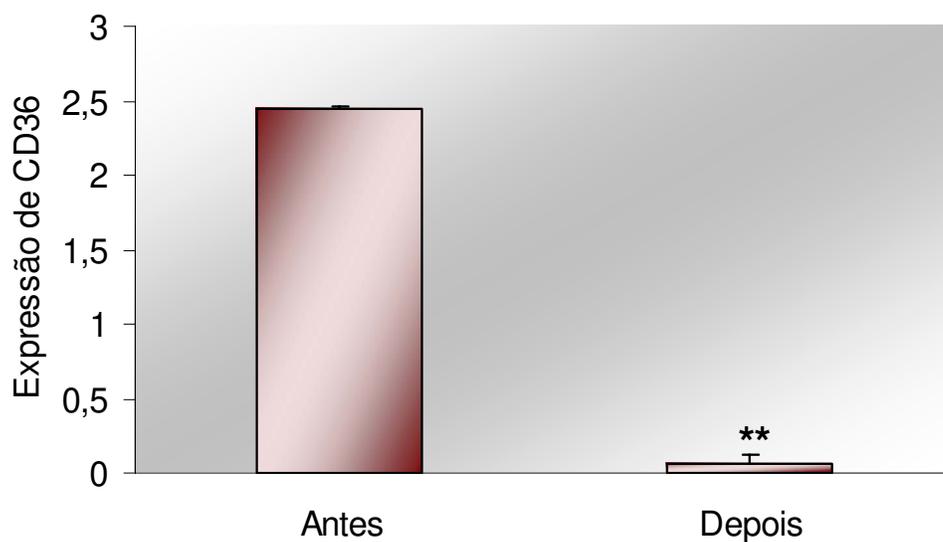


Figura 19- Expressão do gene CD36 em reticulócitos de um paciente SS antes e depois da terapia com HU. ** $p < 0,01$, Teste T pareado.

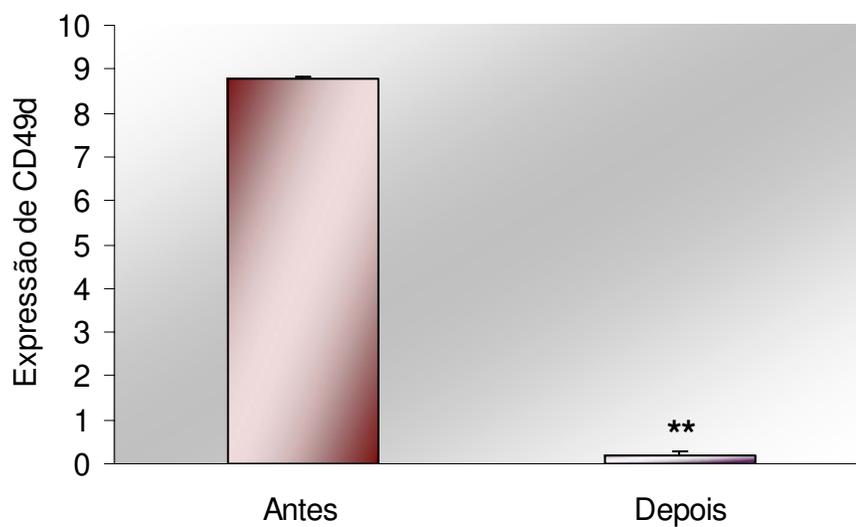


Figura 20- Expressão do gene CD49d (subunidade $\alpha 4$ da molécula VLA-4), em reticulócitos de um paciente SS antes e depois da terapia com HU. ** $p < 0,01$, Teste T pareado.

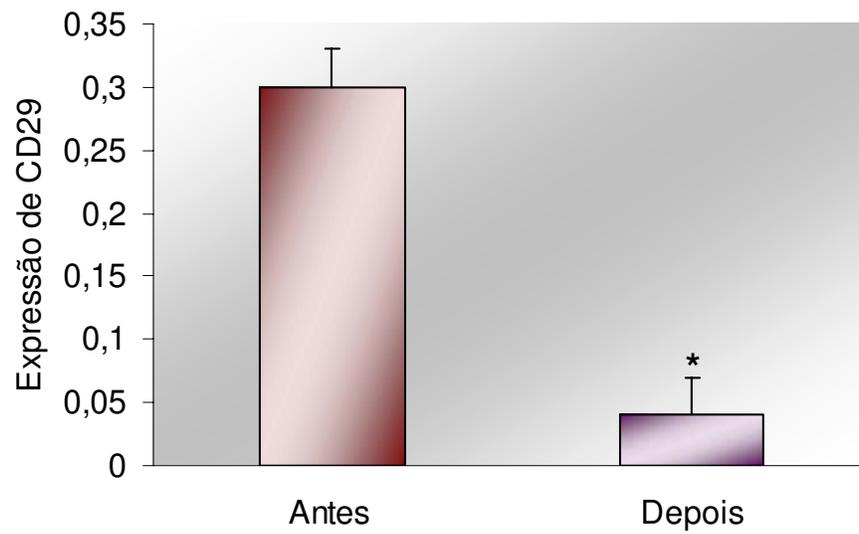


Figura 21- Expressão do gene CD29 (subunidade β 1 da molécula VLA-4), em reticulócitos de um paciente SS antes e depois da terapia com HU. * $p < 0,05$, Teste T pareado.

5- DISCUSSÃO

A fisiopatologia da vaso-oclusão falciforme envolve muitos fatores; dentre eles a desidratação celular, polimerização da hemoglobina S, interação célula-célula e célula endotélio (Gee & Platt, 1995). Hebbel e cols (1980) foram os primeiros a descrever a aderência anormal das células falciformes. A partir dessas primeiras observações muitos estudos têm sido realizados com o intuito de elucidar os mecanismos pelo qual as células vermelhas falciformes aderem ao endotélio.

As células vermelhas falciformes, diferentemente das células vermelhas normais, aderem avidamente a componentes da parede vascular. Acredita-se que é essa adesão anormal que contribui para crises vaso-oclusivas que ocorrem em pacientes com anemia falciforme (Hines, 2003). Nossos resultados com ensaio de adesão estático demonstram que, em níveis basais, as células vermelhas falciformes aderem significativamente mais a FN do que as células vermelhas normais. No entanto células vermelhas de pacientes falciformes tratados com HU apresentam uma adesão basal diminuída em relação às células vermelhas falciformes de pacientes que não recebem tratamento (Figura 9). Resultados similares foram obtidos por Space (2000) que demonstrou através do ensaio de adesão em fluxo que as células falciformes tem propriedades adesivas aumentadas, para células endoteliais, em relação às células vermelhas de indivíduos normais. Também em 2000 Hillery demonstrou que células vermelhas de pacientes em terapia com HU apresentam diminuição da adesão para laminina e trombospondina *in vitro*. Steinberg (2003) acompanhou por nove anos pacientes com terapia de HU, e indicou que essa terapia apresenta diminuição das crises vaso-oclusivas em adultos com as formas moderadas e severas da doença.

A produção diária de hemácias corresponde a 0,83% do total de células, e como o reticulócito persiste em circulação durante 1 ou 2 dias, estão presentes no sangue de indivíduos normais cerca de 0,8 – 1,6% de reticulócitos (Zago, 2001). Os reticulócitos são formados após o eritroblasto ortocromático, já com o núcleo degenerado, sofrer o fenômeno de enucleação. Essa célula originada, ainda mantém grande quantidade de RNA em seu citoplasma preservando a capacidade de síntese protéica, e sai da medula óssea sendo liberado na corrente sanguínea. Em um trabalho de 1997, Hebbel demonstrou que pacientes com anemia falciforme possuem no sangue periférico muitas células jovens que saem

prematuramente da medula óssea. Esse evento estaria relacionado com o estresse anêmico, provocado pela destruição das células rígidas e desidratadas, entre outros.

No entanto a presença de reticulócitos na população de células vermelhas falciformes não parece justificar completamente o aumento das propriedades adesivas dessas células, nem a diminuição dessas propriedades em células de pacientes que tomam terapia com HU. Além disso, uma população de células vermelhas de pacientes com esferocitose hereditária, que apresentam reticulocitose, não demonstrou diferença das propriedades adesivas em relação ao controle. Assim como, embora os níveis de adesão basal das células vermelhas do grupo de pacientes com terapia de HU, sejam próximos aos níveis de adesão encontrada nas células vermelhas normais, a porcentagem de reticulócitos foi significativamente maior do que no controle.

Alguns autores atribuem o aumento da adesão *in vitro* das células vermelhas falciformes à presença de células jovens da população eritróide (Elion *et al.*, 2004). Nossos experimentos, por citometria de fluxo, apresentaram uma diferença de células positivas para CD71, que marca células jovens, na população eritróide de pacientes SS com e sem terapia com HU em relação aos controles. Pacientes falciformes sem terapia com HU possuem níveis maiores de células CD71⁺ em relação às células vermelhas normais e de pacientes com terapia com HU, no entanto não encontramos diferenças significativas entre os grupos de pacientes falciformes com e sem terapia (Tabela 4 e 5).

Nossos resultados, com citometria de fluxo demonstraram que, em níveis basais, há a maior expressão proteica de receptores CD36 e CD49d em células vermelhas de pacientes SS com e sem terapia com HU, quando comparados com células vermelhas de indivíduos normais, e que a porcentagem de células positivas para esses receptores, encontradas nos pacientes com e sem terapia também diferem dos níveis encontrados nas células vermelhas normais (Tabela 4 e 5), indicando que há uma maior expressão dessas moléculas de adesão nas células de indivíduos falciformes, o que poderia explicar o aumento das propriedades adesivas dessas células. Observamos ainda que, quando comparamos o grupo de pacientes que tomam terapia com HU com o grupo de pacientes sem terapia, houve uma diminuição significativa dos níveis de expressão protéica das moléculas de superfície CD36 e CD49d e da porcentagem de células positivas para essas

moléculas no grupo de pacientes que tomam terapia com HU, indicando que a HU reduz a expressão e a quantidade dessas moléculas nas células vermelhas de pacientes com anemia falciforme (Tabela 4 e 5). Em 2004, Covas e colaboradores apresentaram um estudo com análise da expressão por citometria de fluxo, de moléculas de adesão, dentre elas o CD36 e subunidade $\alpha 4$ (CD49d) da molécula VLA-4, e constataram que durante o tratamento com HU a porcentagem de reticulócitos CD 49d⁺ e CD36⁺ diminuem.

Segundo Hebbel (1996), a presença de CD36 em reticulócitos estressados pode ser de fundamental importância na vaso-occlusão, pois a molécula CD36 pode facilitar a aderência, via trombospondina, das células vermelhas ao endotélio vascular. Assim como, alguns estudos têm demonstrado que as mais fortes aderências das células falciformes ao endotélio são por via VLA-4, pois quando esta molécula participa do processo de adesão, a FN e a molécula VCAM-1 estão envolvidas simultaneamente (Smolinski *et al.*, 1995).

Há duas maneiras de alterar as propriedades adesivas: a primeira é a mudança na afinidade das moléculas de adesão (alteração funcional) onde há evidências que NO pode atuar; e a segunda forma, é através de alterações dos mecanismos pós transcricionais ou alterações na expressão gênica das proteínas de superfície dessas células.

Analisamos então, a expressão gênica das moléculas de adesão CD36 e VLA-4, cadeia $\alpha 4$ e $\beta 1$ genes CD49d e CD29 respectivamente, por PCR quantitativo em tempo real em reticulócitos de pacientes com anemia falciforme com e sem terapia com HU. Observamos que os níveis de expressão dos genes CD36, CD49d e CD29 em reticulócitos de pacientes SS sem terapia são significativamente mais altos dos níveis encontrados nos reticulócitos de pacientes em terapia com HU (Figuras 16, 17 e 18 respectivamente). Quando avaliamos a expressão gênica em um mesmo paciente antes e depois da terapia com HU, demonstramos novamente que há uma diminuição de expressão gênica dessas moléculas de adesão após a terapia com HU (Figuras 19, 20 e 21), sendo este o primeiro relato da análise da expressão gênica dessas moléculas de adesão em reticulócitos de pacientes com anemia falciforme. Costa (2004) realizou pela metodologia de SAGE a análise serial do perfil de expressão gênica de células de medula óssea de um paciente antes e depois da terapia com HU, os resultados obtidos indicaram alterações significativas no padrão de expressão gênica causada pela HU.

O tratamento *in vitro* células vermelhas normais e falciformes com HU para realizar o ensaio de adesão estático para FN, demonstrou que as células vermelhas normais e falciformes não apresentaram modificação na adesão para as diferentes concentrações de HU testadas. O tratamento das células vermelhas falciformes e normais com doadores de NO em diversas concentrações também não apresentou alteração significativa.

O tratamento das células vermelhas normais e falciformes com DBcGMP (dibutyryl cGMP), um análogo de GMPc, teve como resultado um aumento na adesão tanto em células vermelhas normais quanto em células falciformes. Há evidências que a via dependente em AMPc (adenosina monofosfato cíclico) tem importância na expressão e função das moléculas de adesão na superfície de hemácias, e que o tratamento com agentes que elevam o AMPc, como a epinefrina, leva à aumento de adesão das células vermelhas falciformes para laminina (Hines, 2003). Portanto, é possível que o aumento da adesão de hemácias observado na presença de DBcGMP seja a consequência de uma interação (ou *cross-talk*) entre as vias dependentes de GMPc e AMPc nas hemácias (Inoue *et al.*, 2004). Futuros experimentos utilizando inibidores das vias dependentes de GMPc/AMPc talvez esclarecerão estes resultados.

Em resumo, nossos resultados sugerem que: as propriedades adesivas à FN são aumentadas em células SS e que estas propriedades diminuem nos pacientes que tomam a terapia de HU; a terapia com HU diminui a expressão protéica e a positividade, das células vermelhas falciformes, hemácias e células jovens, para os receptores CD36 e CD49d; e a expressão gênica das moléculas de adesão CD36 e CD49d em reticulócitos de pacientes com anemia falciforme que recebem terapia com HU é diminuída em relação ao grupo de pacientes falciformes que não recebem essa terapia.

6- CONCLUSÃO

Este trabalho apresenta novas evidências indicando que a terapia com HU reduz as propriedades adesivas das células vermelhas de pacientes com anemia falciforme. Ainda demonstramos que a diminuição das propriedades adesivas não está diretamente relacionada às alterações no número de reticulócitos. A diminuição da adesão foi acompanhada por uma redução na expressão protéica das moléculas da adesão CD36 e VLA-4. Nossos dados sugerem que estas reduções, tanto na expressão protéica quanto nas propriedades adesivas, possam ser mediadas pela diminuição na expressão gênica destas moléculas.

7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adorno, E.V. Anemia falciforme em Salvador-Bahia: Caracterização fenotípica, molecular e de seqüências gênicas potencialmente importantes na expressão dos genes gama da hemoglobina fetal. Tese de doutorado. **Universidade Federal da Bahia, Faculdade de Medicina. Centro de Pesquisas Gonçalo Muniz.** 2005.

Adorno, E.V.; Couto, F.D.; Moura Neto, J.P.; Menezes, J.F.; Rego, M.; Reis, M.G.; Gonçalves, M.S. Hemoglobinopathies in newborns from Salvador, Bahia, Northeast Brazil. **Cad. Saude Pública.** 21: 292-298, 2005.

Alberts, B.; Bray, D.; Johnson, A.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, K.; Walter, R.P. Tecnologia de DNA. Fundamentos da Biologia Celular: Uma introdução à biologia molecular da célula. **ArtMed**, Porto Alegre, 1999, pp. 35.

Anyaegbu, C.C.; Okpala, I.E.; AkenÓva, A.Y.; Salimonu, L.S. Peripheral blood neutrophil count and candidacidal activity correlate with the clinical severity of sickle cell anemia. **Eur. J. Haematol.** 60: 267-8, 1998.

Araújo, M.C; Serafim, E.S.; De Castro Jr., W.A.; De Medeiros, T.M.. Prevalence of abnormal hemoglobins in newborns in Natal, Rio Grande do Norte, Brazil. **Cad. Saúde Pública.** 20: 123-128, 2004.

Assis, A.; Conran, N.; Canalli, A.A.; Lorand-Metze, I.; Saad, S.T.; Costa, F.F. Effect of cytokines and chemokines on sickle neutrophil adhesion to fibronectin. **Acta Haematol.** 113(2):130-6, 2005.

Ballas, S.K.; Smith, E.D. Red blood cell changes during the evolution of the sickle cell painful crisis. **Blood.** 79: 2154-2163, 1992.

Bandeira, F.M.G.C.; Leal, M.C.; Souza, R.R.; Furtado, V.C.; Gomes, Y.M.; Marques, N.M. Características de recém nascidos portadores de hemoglobina "S" detectados através de triagem em sangue de cordão umbilical. **J. Pediatr., Rio de Janeiro.** 75: 167-171, 1999.

Belcher, J.D.; Marker, P.H.; Weber, J.P. Activated monocytes in sickle cell disease: potential role in the activation of vascular endothelium and vasoocclusion. **Blood.** 96: 2451-2459, 2000.

- Brandelise, S.; Pinheiro, V.; Gabetta, C.S.; Hambleton, I.; Serjeant, B.; Serjeante, G. Newborn screening for sickle cell disease in Brazil: the Campinas experience. **Clin. Lab. Haematol.** 26: 15-19, 2004.
- Browne, P.V.; Hebbel, R.P. CD36 positive stress reticulocytosis in sickle cell anemia. **J. Lab. Clin. Méd.** 127(4): 340-347, 1996.
- Bruckdorfer, R. The basics about nitric oxide. **Molecular Aspects of Medicine.** 26: 3-31, 2005.
- Bundy, R.; Marczin, N.; Chester, A.H.; Yacoub, M. Differential regulation of DNA synthesis by nitric oxide and hydroxyurea in vascular smooth muscle cells. *American Journal of Physiology.* 277: 1799-807, 1999.
- Canalli, A.A. Função e expressão das integrinas nos eosinófilos de pacientes com Anemia Falciforme. Tese de mestrado. **Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.** 2004.
- Canalli, A.A.; Conran, N.; Fattori, A; Saad, S.T.O.; Costa, F.F. Increased adhesive properties of eosinophils of sickle cell anemia. **Experimental Hematology.** 32: 728-34, 2004.
- Carlos, T.M.; Harlan, J.M.; Leukocytes-endothelial adhesion molecules. **Blood.** 84: 2068, 1994.
- Castro, O.; Branbilla, D.J.; Thorington, B.; Reindorf, C.A.; Scott, R.B.; Gillette, P.; Vera, J.C.; levy, P.S. The acute syndrome in sickle cell disease: incidence and risk factors. The cooperative study of sickle cell disease. **Blood.** 84: 643-49, 1994.
- Charache, S.; Barton, F.B.; Moore, M.D.; Terrin, M.L.; Steimberg, M.H.; Dover, G.J.; Ballas, S.K.; McMahan, R.P.; Castro, o.; Orringer, E.P.; and the Investigators of the Multicenter Study of Hydroxyurea in Sickle Cell Anemia. Hydroxyurea and Sickle cell anemia. **Medicine** 75:300-26, 1996.
- Charache, S.; Terrin, M.L.; Moore, M.D.; Dover, G.J.; Barton, F.B.; Eckert, S.V.; McMahan, R.P.; Bonds, D.R.; and the Investigators of the Multicenter Study of Hydroxyurea in Sickle Cell Anemia. Effects of hydroxyurea on the frequency of painful crises in sickle cell anemia. **N. Engl. J. Med.** 332:1317-22, 1995.

Chiang, E.Y.; Frenette, P.S. Sick cell vaso-occlusion. **Hematology/Oncology Clinics**. 19: 771-784, 2005.

Cokic, V. P.; Smith, R. D.; Beleslin-Cokic, B. B.; Njoroge, J. M.; Miller, J. L.; Gladwin, M. T. et al. Hydroxyurea induces fetal hemoglobin by the nitric oxide-dependent activation of soluble guanylate cyclase. **J Clin Invest**, 111(2): 231-9, 2003.

Cokic, V.P.; Beleslin-Cokic, B.B.; Tomic, M.; Stojilkovic, S.S.; Noguchi, C.T.; Schechter, A.N. Hydroxyurea induces the eNOS-cGMP pathway in endothelial cells. **Blood** 2006; in press online.

Conforti, G.; Dominguez-Jimenez, C.; Zanetti, A.; Gimbrone, M.A.; Cremona, O.; Marchisio, P.C.; Dejana, E. Human endothelial cells express integrin receptors on the luminal aspect of their membrane. **Blood**. 80: 437, 1992.

Conran N, Oresco-Santos C, Acosta HC, Fattori A, Saad ST, Costa FF. Increased soluble guanylate cyclase activity in the red blood cells of sickle cell patients. **Br J Haematol**. 124(4): 547-54, 2004

Costa, F.C. Padrões de expressão gênica em células da medula óssea caracterizam mecanismos de ação da hidróxiuréia na anemia falciforme. Tese de doutorado. **Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas**. 2004.

Costa, F.F. Anemia Falciforme. In: Zago, M.A.; Falcão, R.P.; Pasquini, R. Hematologia, Fundamentos e Prática. 1ª reimpressão, 1ª edição, São Paulo. **Atheneu**. Cap 7, p. 289-308, 2004.

Covas, D.T.; Ângulo, I.L.; Palma, P.V.B.; Zago, M.A. Effects of hydroxyurea on the membrane of erythrocytes and platelets in sickle cell anemia. **Haematologica**. 89: 273-80, 2004.

De Franceschi, L.; Corrocher, R. Established and experimental treatments for sickle cell disease. **Haematologica**. 89: 348-56, 2004.

Denninger, J. W.; Marletta, M. Guanylate cyclase and the NO/cGMP signaling pathway. **Biochimica et Biophysica Acta**, 1411: 334-50, 1999.

Elion, J.E.; Brun, M.; Odievre, M.H., Lapoum roulie, C.L.; Krishnamoorthy, R. Vaso-occlusion in sickle cell anemia: role of interactions between blood cells and endothelium. **The Hematology Journal**. 5: S195-198, 2004.

Emmel, V.E. A study of the erythrocytes in a case of severe anemia with elongated and sickle-shaped red blood corpuscles. **Arch. Intern. Med.** 20: 586-598, 1917.

Fadlon, E.; Vordermeier, S.; Pearson, T.C.; Mire-Sluis, A.R.; Dumonde, D.C.; Phillips, J.; Fishlock, K.; Brown, K.A. 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**, 91(1): 266-74, 1998.

Francis, R.B. Jr. & Haywood, L.J. Elevated immunoreactive tumor necrosis factor and interleukin-1 in sickle cell disease. **J. Nat. Med. Assoc.** 84(7): 611-615, 1992.

Gee, B.E.; Platt, O.S. Sickle reticulocytes adhere to VCAM-1 **Blood**. 85: 268-274, 1995.

Gladwin, M.T.; Schechter, A.N. Nitric oxide therapy in sickle cell disease. **Semin. Hematol.** 38: 333-342, 2001.

Gladwin, M.T.; Shelhamer, J.H.; Ognibene, F.P.; Pease-Fye, M.E.; Nichols, J.S.; Link, B.; Patel, D.B.; Jankowski, M.A.; Pannell, L.K.; Schechter, A.N.; Rodgers, G.P. Nitric oxide donor properties of hydroxyurea in patients with sickle cell disease. **Br. J. Haematol.**, 116: 436-44, 2002.

Greenwalt, D.E.; Lipsky, R.H., Ockenhouse, C.F., Ikeda, H.; Tandon, N.N.; Jamieson, G.A. Membrane glycoprotein CD 36: A review of its role in adherence, signal transduction, and transfusion medicine. **Blood**. 80: 1105, 1992.

Halsey, C.; Roberts, I.A. The role of hydroxyurea in sickle cell disease. **Br. J. of Haematol.** 120(2): 177-186, 2003.

Halsey, C.; Roberts, I.A.G.; The role of hydroxyurea in sickle cell disease. **Br. J. Hematol.** 120:177-86, 2003.

Hebbel, R.P. Blockade of adhesion of sickle cells to endothelium by monoclonal antibodies. **N. Engl. J. Med.** 342(25): 1910-1912, 2000.

Hebbel, R.P. Perspectives series: cell adhesion in vascular biology. Adhesive interactions of sickle erythrocytes with endothelium. **J. Clin Invest.** 99: 2561-2564, 1997.

Hebbel, R.P.; Marc, M.D.; Boogaerts, B.; Eaton, J.W.; Steinberg, M.H. Erythrocytes adherence to endothelium in sickle cell anemia: A possible determinant of disease severity. **N. Engl. J. Med.** 302: 992, 1980.

Hebbel, R.P.; Yamada, O.; Moldow, C.F.; Jacobs, H.S.; White, J.J.; Eaton, J.W. Abnormal adherence of sickle erythrocytes to cultured vascular endothelium. Possible mechanism for microvascular occlusion in sickle cell disease. **J. Clin. Invest.** 65: 154-160, 1980.

Herrick, J.B. Peculiar elongated and sickle-shaped red blood corpuscles in a case of severe anemia. **Arch. Intern. Med.** 6: 517-521, 1910.

Hillery, C.A.; Du, M.C.; Wang, W.C.; Scott, J.P. Hydroxiurea therapy decreases the *in vitro* adhesion of sickle erythrocytes to thrombospondin and laminin. **British J. of Haematology.** 109: 322-327, 2000.

Hines, P.C.; Zen, Q.; Burney, S.N.; Shea, D.; Ataga, K.I.; Orringer, E.P.; Telen, M.J.; Parise, L.V. Novel epinephrine and cyclic AMP-mediated activation of BCAM/LU-dependent sickle (SS) RBC adhesion. **Blood.** 101(8): 3281-87, 2003.

Hoover, R.; Rubin, R.; Wise, G.; Warren, R. Adhesion of normal and sickle erythrocytes to endothelial monolayer cultures. **Blood.** 54 (4): 872-6, 1979.

Hoover, R.; Rubin, R.; Wise, G.; Warren, R. Adhesion of normal and sickle erythrocytes to endothelial monolayer cultures. **Blood.** 54: 872-876, 1979.

Ignarro, L.J.; Byrns, R.E.; Buga, G.M.; Wood, K.S. Endothelium-derived relaxing factor from pulmonary artery and vein possesses pharmacologic and chemical properties identical to those of nitric oxide radical. **Circ. Res.** 61(6): 866-879, 1987.

Ikuta, T.; Ausenda, S.; Cappelini, M.D. Mechanism for fetal globin gene expression: role of the soluble guanylate cyclase-cGMP-dependent protein Kinase pathway. **Proc Natl Acad Sci USA,** 98: 4, 2001.

Ingram, V.M. A specific chemical difference between the globins of normal human and sickle-cell anaemia haemoglobin. **Nature.** 178: 792-794, 1956.

Joneckis, C.C.; Ackley, R.L.; Orringer, E.P.; Wayner, E.A.; Parise, L.V. Integrin- $\alpha_4\beta_1$ and glycoprotein IV (CD 36) are expressed on circulating reticulocytes in sickle cell anemia. **Blood**. 82: 3548, 1993.

Kasschau, M.R.; Barabino, G.A.; Bridges, K.R.; Golan, D.E. Adhesion of sickle neutrophils and erythrocytes to fibronectin. **Blood**, 87: 771-80, 1996.

King, S.B. Nitric oxide production from hydroxyurea. **Free Radical Biology & Medicine**, 37(6):737-44, 2004.

Knouf, N.S.; Stuehr, D.J.; Nathan, C.F. Inhibition of tumor cell ribonucleotide reductase by macrophage-derived nitric oxide. **Journal of Experimental Medicine**. 174: 761-67, 1991.

Labie, D.; Elion, J. Molecular and cellular pathophysiology of sickle cell anemia. **Pathol Biol**. 47: 7-12, 1999.

Lard, L.R.; Mul, F.P.J.; De Haas, M. Neutrophil activation in sickle cell disease. **J. Leukocyte Biol**. 66: 411-415, 1999.

Lassmann, G.; Thelander, L.; Graslund, A. EPR stopped-flow studies of the reaction of the tyrosyl radical of protein R2 from ribonucleotide reductase with hydroxyurea. **Biochemistry and Biophysics Research Communications**. 188: 879-87, 1992.

Lepoivre, M.; Flaman, J.M.; Bobe, P ; Lemaire, G. ; Henry, Y. Quenching of tyrosyl free radical of ribonucleotide reductase by nitric oxide. Relationship to cytostasis induced in tumor cells by cytotoxic macrophages. **Journal of Biological Chemistry**. 269: 21891-897, 1994.

Lopez, B.L.; Barnett, J.; Ballas, S.K.; et al. Nitric oxide metabolite levels in acute vaso-occlusive sickle cell crisis. **Acad Emerg. Med**. 3: 1098-103, 1996.

Lopez, B.L.; Davis-Moon, L.; Ballas, S.K.; Ma, X. Sequential Nitric oxide measurements during the emergency department treatment of acute vasoocclusive sickle cell crisis. **Am. J. Hem.**, 64: 15-19, 2000.

Low, S.Y. Application of pharmaceuticals to nitric oxide. **Molecular Aspects of Medicine**. 26: 97-138, 2005.

- Lutty, G.A.; Taomoto, M.; Cão, J.; McLeod, D.S.; Vanderslice, D; McIntyre, B.N.; Fabry, M.E.; Nagel, R.L. Inhibition of TNF-alpha-induced sickle RBC retention in retina by VLA-4 antagonist. **Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.** 42(6): 1349-1355, 2001.
- Mack, A.K.; Kato, G.J. Sickle cell disease and nitric oxide: Aparadigm shift? **The Int. J. of Biochemistry & Cell Biology.** 2006, in press on line.
- Manodori, A.B.; Barabino, G.A.; Lubin, B.H.; Kuypers, F.A.; Adherence of phosphatidyl-exposing erythrocytes to endothelial matrix thrombospondin. **Blood.** 95: 1293-300, 2000.
- Meijerink, J.; Mandigers, C.; Locht, L.V.; Tönnissen, E.; Goodsaid, F.; Raemaekers, J. A novel method to compensate for different amplification efficiencies between patient DNA samples in quantitative real-time PCR. **J. of Molecular Diagnostics.** 3(2): 55-61,2001.
- Morris, C.R.; Kuypers, F.A.; Larkin, S.; Sweeters, N.; Simon, J.; Vichisky, E.P.; Stytes, L.A. Arginine therapy: a novel strategy to induce NO production in sickle cell disease. **Br. J. Haematol.** 111: 498-500, 2000.
- Morris, C.R.; Vichinsky, E.P.; Van Warmerdam, J.; Machado, L.; Larkin, S.; Kuypers, F.A. Hydroxyurea and arginine therapy: Impact on nitric oxide production in sickle cell disease. **Blood** suppl: 3262, 2001.
- Naoum, P.C. Hemoglobinopatas e Talassemias. São Paulo, 1ª ed. **Sarvier.** 1997.
- Natarajan, M.; Udden, M.M., McIntire, L.V. Adhesion of sickle red blood cells and damage to interleukin-1 beta stimulated endothelial cells under flow in vitro. **Blood.** 87: 4845-4852, 1996.
- Neel, J.V. The inheritance of sickle cell anemia. **Science.** 110: 64-66, 1949.
- Okpala, I. Leukocyte adhesion and the pathophysiology of sickle cell disease. **Current Opinion in Hematology.** 13: 40-44, 2006.
- Okpala, I.E.; Daniel, I.; Haynes, R.; Odoemene, D.; Goldman, J. Relationship between the clinical manifestations of sickle cell disease and the expression of adhesion molecules on white blood cells. **Eur. J. Haematol.** 69: 135-44, 2002.
- Okumura, N.; Tsuji, K.; Nakahata, T. Changes in cell surface antigen expressions during proliferation and differentiation of human erythroid progenitors. **Blood.** 80: 642, 1992.

Owens, M.A. & Loken, M.R. Flow cytometry principles for clinical laboratory practice. New York – EUA. **Ed. Wiley Liss.** 224p, 1995.

Pauling, L.; Itano, H.A.; Singer, S.J.; Wells, I.C. Sick cell anemia: A molecular disease. **Science.** 110: 543-548, 1949.

Platt, O.; Thorington, M.S.; Branbilla, D.J.; Milner, P.F.A.; Rosse, W.F.; Vichinsky, E.; Kinney, T.R. Pain in sickle cell disease: Rates and risk factors. **N. Engl. J. Med.** 325: 11, 1991.

Platt, O.S.; Brambilla, D.J.; Rosse, W.F.; Milner, P.F.; Castro, O.; Steinberg, M.H.; Klug, P.P. Mortality in sickle cell disease: Life expectancy and risk factors for early death. **N. Engl. J. Med.** 330: 1639-44, 1994.

Ramalho, A.S. As hemoglobinopatias hereditárias: um problema de saúde pública no Brasil. Ribeirão Preto: **Sociedade Brasileira de Genética.** v 1, 160 p., 1986.

Rees, D.C.; Cervi, P.; GrimWade, D.; O`Driscoll, A.; Hamilton, M.; Parker, N.E. et al. The metabolites of nitric oxide in sickle cell disease. **Br. J. Haematol.** 91: 834-7, 1995.

Roseblatt, M.; Vuillet-Gaugler, M.H.; Leroy, C.; Coulombel L. Coexpression of two fibronectin receptors, VLA-4 and VLA-5, by immature human erythroblastic precursor cells. **J Clin Invest.** 87 (1): 6-11, 1991.

Rosse, W.F.; Mohandas, N.; Petz, L.D.; Steinberg, M.H. New views of sickle cell disease, pathophysiology and treatment. **Hematology** (Am Soc Hematol Educ Program): 2-17, 2000.

Schechter, A.N.; Rodgers, G.P. Sick cell anemia therapy: progress since Pauling. **Science.** 287: 592-593, 2000.

Serjeant, G.R.; Serjeant, B.E. Sick cell disease. **Oxford University Press,** New York. 3rd edition, 2001.

Shiu, Y.; Udden, M.M.; McIntire, L.V. Perfusion with sickle erythrocytes up-regulates ICAM-1 and VCAN-1 gene expression in cultured human endothelial cells. **Blood,** 95(10): 3232-41, 2000.

- Smyth, S.S.; Joneckis C.C; Parise, L.V. Regulation of vascular integrins. **Blood**. 81 :2827, 1993.
- Solovey, A.; Lin, Y.; Browne, P.; Choong, S.; Wayner, E.; Hebbel, R.P. Circulating activated endothelial cells in sickle cell anemia. **N. Engl. J. Med.** 337: 1584-1590, 1997.
- Solovey, A.A.; Solovey, A.N.; Harkness, J.; Hebbel, R. Modulation of endothelial cell activation in sickle cell disease: a pilot study. **Blood**. 97(7): 1937-41, 2001.
- Space, S.L.; Lane, P.A.; Pickett, C.K. Weil, J.V. Nitric oxide attenuates normal and sickle red blood cell adherence to pulmonary endothelium. **Am. J. Hematol.** 63: 200-04, 2000.
- Steinberg, M.H.; et al. Effects of hydroxiurea on mortality and morbidity in adult sickle cell anemia. **Jama**. 289(13): 1645-50, 2003.
- Steinberg, M.H.; Forget, B.G.; Higgs, D.R.; Nagel, R.L. Disorders of Hemoglobin. **Cambridge University Press**. 2001.
- Stoeckert, C.J.; Green, M.B. Erythropoietin and hydroxyurea can act on early erythroid progenitors from adult human peripheral blood to modulate fetal globin mRNA levels. **Experimental Hematology**. 22: 278-282, 1994.
- Stuart, M.J.; Nagel, R.L. Sickle-cell disease. **Lancet**. 364: 1343-1360, 2004.
- Stuart, M.J.; Setty, B.N. Sickle cell acute chest syndrome: pathogenesis and rationale for treatment. **Blood**. 94: 1555-60, 1999.
- Stuart, M.J; Nagel, R.L. Sickle cell disease. **Lancet**. 364: 1343-60, 2004.
- Styles, L.A.; Lubin, B.; Vichinsky, E.; Lawrence, S.; Hua, M.; Test, S.; Kuypers, F. Decrease of very late activation antigen-4 and CD 36 on reticulocytes in sickle cell patients treated with hydorxyurea. **Blood**. 98(7): 2554-59, 1997.
- Sugihara, K.; Sugihara, T.; Mohandas, N.; Hebbel, R.P. Thrombospondin mediates adherence of CD36⁺ sickle reticulocytes to endothelial cells. **Blood**. 80(10): 2634-2642, 1992.
- Swerlick, R.A.; Eckman, J.R.; Kumar, A.; Jeitler, M. Wick, T.M. $\alpha 4\beta 1$ - integrin expression os sickle reticulocytes: Vascular cell adhesion molecule-1 dependent binding to endothelium. **Blood** 82: 189, 1993.

Taliaferro, W.H.; Huck, J.G. The inheritance of sickle-cell anemia in man. **Genetics**. 8: 594-598, 1923.

Tavakkoli, F.; Nahavandi, M.; Wyche, M.Q.; Perlin, E. Plasma levels of TNF-alpha in sickle cell patients receiving hydroxyurea. **Hematology**. 9(1): 61-64, 2004.

Vandesompele, J.; De Preter, K.; Pattyn, F.; Poppe, B.; Van Roy, N.; De Paepe, A.; Speleman, F. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. **Genome Biol**. 3: 34, 2002.

Yarbro, J.W. Mechanism of action of hydroxyurea. **Seminars on Oncology**. 19: 1-10, 1992.

8- ANEXOS



TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (CONTROLE)



“Efeitos de doadores de NO e HU na expressão e função das moléculas de adesão em células vermelhas de pacientes com anemia falciforme”.

Objetivo: Analisar a expressão e função das moléculas de adesão VLA-4 e CD 36 em células vermelhas de pacientes com Anemia Falciforme e a resposta dessas células quando tratadas com substâncias doadoras de óxido nítrico.

A Anemia falciforme afeta grande número de pessoas no Brasil, alguns estudos já realizados indicam que algumas moléculas presentes nas células vermelhas de pessoas com esta anemia podem estar relacionadas com as crises de oclusão vascular, que é uma característica dessa doença, sabe-se ainda que o óxido nítrico pode alterar o funcionamento dessas moléculas. Para tentar entender esse mecanismo é que estamos realizando este trabalho, já que este conhecimento pode contribuir de forma indireta para a melhoria da terapia da anemia falciforme. Para isso, como você não tem a anemia falciforme, estamos pedindo sua colaboração. A participação de pessoas saudáveis na pesquisa não implica em nenhum benefício para as mesmas, uma vez que servirão apenas como controles normais dos níveis de expressão e atividade dessas moléculas.

Caso você não queira participar, não terá qualquer problema. Em nada será alterado o seu tratamento no Hemocentro e no Hospital das Clínicas da UNICAMP. Caso concorde em participar, leia atentamente o que está escrito abaixo e assine duas vias desse termo. Uma delas será entregue a você.

Estou ciente de que para participar do estudo que me foi explicado, serão coletados 16 ml de sangue (mais ou menos 5 colheres de sopa) a ser colhida em veia de um dos braços. Estou ciente de que os riscos do procedimento são os mesmos que terei com a coleta das amostras para exames de rotina (hematoma (“roxidão”) no local da coleta de sangue). Sei que posso sair do estudo a qualquer momento e que isto não vai prejudicar o meu tratamento na UNICAMP. Sei ainda que meus dados serão mantidos em sigilo pelo pesquisador.

Se tiver qualquer dúvida sobre o estudo poderei procurar pela aluna de mestrado **Sheley Gambero** (F: 3788-8734, pesquisadora responsável pelo estudo) ou o **Prof. Dr. Fernando Ferreira Costa** (F:3188-8734, orientador responsável pelo estudo)ou a **Dra. Nicola Conran Zorzeto** (F: 3188-8734, co-orientadora responsável pelo estudo), Hemocentro, UNICAMP. Qualquer reclamação sobre o procedimento do estudo poderei procurar a secretaria do **Comitê de Ética da FCM, UNICAMP**, Fone: 3788-836.

Eu li/ouvi o conteúdo deste termo e recebi esclarecimentos sobre as minhas dúvidas oralmente.

Nome:.....

Idade:.....anos RG:..... HC:.....

Endereço:.....

Nome do responsável legal (se o paciente menor de idade):.....

RG:..... Grau de parentesco:.....

Endereço:.....

.....

Assinatura do paciente

.....

Assinatura do pesquisador legal

Campinas,...../...../.....



TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (PACIENTE)



“Efeitos de doadores de NO e HU na expressão e função das moléculas de adesão em células vermelhas de pacientes com anemia falciforme”.

Objetivo: Analisar a expressão e função das moléculas de adesão VLA-4 e CD 36 em células vermelhas de pacientes com Anemia Falciforme e a resposta dessas células quando tratadas com substâncias doadoras de óxido nítrico.

A Anemia falciforme afeta grande número de pessoas no Brasil, alguns estudos já realizados indicam que algumas moléculas presentes nas células vermelhas de pessoas com esta anemia podem estar relacionadas com as crises de oclusão vascular, que é uma característica dessa doença, sabe-se ainda que o óxido nítrico pode alterar o funcionamento dessas moléculas. Para tentar entender esse mecanismo é que estamos realizando este trabalho, já que este conhecimento pode contribuir de forma indireta para a melhoria da terapia da anemia falciforme. Para isso, como você tem a anemia falciforme, estamos pedindo sua colaboração. A participação de pessoas saudias na pesquisa não implica em nenhum benefício para as mesmas, uma vez que servirão apenas como controles normais dos níveis de expressão e atividade dessas moléculas.

Caso você não queira participar, não terá qualquer problema. Em nada será alterado o seu tratamento no Hemocentro e no Hospital das Clínicas da UNICAMP. Caso concorde em participar, leia atentamente o que está escrito abaixo e assine duas vias desse termo. Uma delas será entregue a você.

Estou ciente de que para participar do estudo que me foi explicado, serão coletados 16 ml de sangue (mais ou menos 5 colheres de sopa) a ser colhida em veia de um dos braços. Estou ciente que os riscos do procedimento são os mesmos que terei com a coleta das amostras para exames de rotina (hematoma (“roxidão”) no local da coleta de sangue). Sei que posso sair do estudo a qualquer momento e que isto não vai prejudicar o meu tratamento na UNICAMP. Sei ainda que meus dados serão mantidos em sigilo pelo pesquisador.

Se tiver qualquer dúvida sobre o estudo poderei procurar pela aluna de mestrado **Sheley Gambero** (F: 3788-8734, pesquisadora responsável pelo estudo) ou o **Prof. Dr. Fernando Ferreira Costa** (F:3188-8734, orientador responsável pelo estudo), ou a **Dra. Nicola Conran Zorzeto** (F: 3188-8734, co-orientadora responsável pelo estudo) Hemocentro, UNICAMP. Qualquer reclamação sobre o procedimento do estudo poderei procurar a secretaria do **Comitê de Ética da FCM, UNICAMP**, Fone: 3788-836.

Eu li/ouvi o conteúdo deste termo e recebi esclarecimentos sobre as minhas dúvidas oralmente.

Nome:.....

Idade:.....anos RG:..... HC:.....

Endereço:.....

Nome do responsável legal (se o paciente menor de idade):.....

RG:..... Grau de parentesco:.....

Endereço:.....

.....

Assinatura do paciente

.....

Assinatura do pesquisador legal

Campinas,...../...../.....