

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**Lívia Gelain Castilhos**

**AVALIAÇÃO DA SINALIZAÇÃO PURINÉRGICA EM PLAQUETAS E  
LINFÓCITOS DE PACIENTES COM ANEMIA FALCIFORME**

**Santa Maria, RS  
2016**

**Lívia Gelain Castilhos**

**AVALIAÇÃO DA SINALIZAÇÃO PURINÉRGICA EM PLAQUETAS E  
LINFÓCITOS DE PACIENTES COM ANEMIA FALCIFORME**

Tese apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Concentração em Análises Clínicas e Toxicológicas da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para a obtenção do Grau de **Doutora em Ciências Farmacêuticas**.

**Orientadora: Prof. (Dr<sup>a</sup>) Daniela Bitencourt Rosa Leal**

Santa Maria, RS, Brasil  
2016



**Lívia Gelain Castilhos**

**AVALIAÇÃO DA SINALIZAÇÃO PURINÉRGICA EM PLAQUETAS E  
LINFÓCITOS DE PACIENTES COM ANEMIA FALCIFORME**

Tese apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Concentração em Análises Clínicas e Toxicológicas da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para a obtenção do Grau de **Doutora em Ciências Farmacêuticas**.

**Aprovado em 17 de março de 2016:**

---

**Daniela Bitencourt Rosa Leal, Dra.**  
**(Presidente/Orientadora)**

---

**Ana Eucares Von Laer, Dra. (UFSM)**

---

**Cleci Menezes Moreira, Dra. (UNIPAMPA)**

---

**Jeandre Augusto Jaques, Dr. (UFMS)**

---

**José Edson Paz da Silva, Dr. (UFSM)**

Santa Maria, RS  
2016

## DEDICATÓRIA

*À minha família e ao Divino...*

*Obrigada pelo sim e pelo não,*

*Pelas mensagens de antemão,*

*Pelo ombro amigo,*

*Pelo sorriso querido,*

*Sei que sempre estarão comigo!*

*Agora e sempre...*

## AGRADECIMENTOS

*Em primeira mão agradeço à minha Família, por me darem a vida e ensinarem a trilhá-la com educação, dignidade, otimismo, amor, sabedoria e gratidão. Aprendi que não é o que nós temos em nossa vida que importa, mas sim quem nós temos em nossa vida!*

*Que a nossa meta seja sempre ser feliz  
E que a nossa mania seja sempre multiplicar a meta!*

*À professora Daniela Bitencourt Rosa Leal, minha orientadora, pela oportunidade de ingressar em seu grupo de pesquisa, por todos os ensinamentos, atenção e dedicação; a minha eterna gratidão. Obrigada pela oportunidade e confiança depositada.*

*Sorrir, agradecer e prosseguir....*

*Aos meus colegas do 4229, minha sincera gratidão por todos os momentos de nossa convivência. Obrigado pelo carinho, coleguismo, amizade e colaboração neste trabalho.*

*Foco, força, determinação e fé dão resultados!*

*Aos meus pacientes voluntários que aceitaram participar da pesquisa, ao Projeto-Pilão, e aos funcionários do Serviço de Hemato-Onco do HUSM, meus sinceros agradecimentos pela ajuda concedida.*

*Vocês também são parte deste trabalho...*

*E acima de tudo sou grata  
ao Divino,  
ao Lafah,  
ao meu mentor espiritual  
de ontem,  
hoje  
e sempre!*

*A Gratidão é o filtro mais bonito do coração!*

*“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu,  
mas pensar o que ninguém ainda pensou  
sobre aquilo que todo mundo vê.”*

*(Arthur Schopenhauer)*

## RESUMO

### AVALIAÇÃO DA SINALIZAÇÃO PURINÉRGICA EM PLAQUETAS E LINFÓCITOS DE PACIENTES COM ANEMIA FALCIFORME

AUTORA: Lívia Gelain Castilhos

ORIENTADORA: Daniela Bitencourt Rosa Leal

As hemoglobinopatias constituem uma das principais e mais frequentes doenças genéticas que acometem os seres humanos. A anemia falciforme (AF) é a forma mais prevalente e com maior gravidade clínica e hematológica, sendo geneticamente determinada pela homozigose da hemoglobina S. A AF está associada a um estado inflamatório sistêmico e crônico, e a um fenótipo pró-adesivo e pró-coagulante sendo a maioria das mortes relacionada às oclusões vasculares. Os nucleotídeos extracelulares ATP, ADP, AMP e o nucleosídeo adenosina são importantes moléculas sinalizadoras que modulam as ações de plaquetas e linfócitos, sendo essenciais para o início e a manutenção das reações inflamatórias. Também atuam efetivamente na regulação da resposta vascular ao dano endotelial por exercerem efeitos nas plaquetas. Os níveis extracelulares destes nucleotídeos são fisiologicamente controlados pela ação de um complexo enzimático formado pelas enzimas E-NTPDase, E-5' nucleotidase e E-ADA. Estas enzimas estão localizadas na superfície de plaquetas e linfócitos e desempenham um papel importante na manutenção da homeostasia normal, prevenindo a excessiva agregação plaquetária, e estando relacionadas à resposta inflamatória. Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar o perfil inflamatório e, a atividade e expressão destas ecto-enzimas em linfócitos e plaquetas de pacientes com AF. Os resultados revelaram que algumas citocinas séricas (TNF- $\alpha$  e IL-6) mostraram-se significativamente reduzidos nos pacientes com AF quando comparado com o controle. Foi observado um aumento na atividade da E-NTPDase (hidrólise de ATP e ADP) nos linfócitos e plaquetas dos pacientes com AF. O aumento em sua atividade leva a manutenção dos níveis fisiológicos destes nucleotídeos no meio extracelular, impedindo um maior dano tecidual e inflamatório e, prevenindo a formação de trombos por equilibrar o metabolismo do ATP e ADP. Embora a atividade da E-NTPDase encontra-se aumentada, uma diminuição na porcentagem de plaquetas que expressam CD39 foi observado nos pacientes com AF, a qual pode estar diretamente relacionado com a terapia utilizada por estes pacientes. Quando avaliou-se a enzima E-5'-nucleotidase, nenhuma diferença estatística foi observada quanto a sua atividade e expressão nas plaquetas destes pacientes. Como um aumento na atividade da E-NTPDase foi observada, sugere-se que o AMP formado esteja sendo reconvertido a ADP pela ação da adenilato kinase 1 (AK1), já que as plaquetas destes pacientes são conhecidas por circular em estado ativado, apresentando alterada agregação plaquetária. Um aumento na atividade da E-ADA foi observado também nos linfócitos e plaquetas destes pacientes. A adenosina é liberada pelas células endoteliais em casos de hipóxia, sendo portanto este aumento na atividade da E-ADA positivo, uma vez que elevadas concentrações desta molécula no meio extracelular é prejudicial na patologia da AF, por levar indiretamente a falcização dos eritrócitos. Dessa forma, podemos concluir que o perfil de citocinas dos pacientes com AF foi alterado e que a regulação extracelular dos nucleotídeos em resposta à hipóxia e inflamação pelas ecto-enzimas representam um importante controle da mediação das purinas nesta patologia.

**Palavras-chaves:** Anemia falciforme. Linfócitos. Plaquetas. Citocinas. Sinalização purinérgica.

## ABSTRACT

### AVALIAÇÃO DA SINALIZAÇÃO PURINÉRGICA EM PLAQUETAS E LINFÓCITOS DE PACIENTES COM ANEMIA FALCIFORME

AUTOR: Livia Gelain Castilhos  
ADVISOR: Daniela Bitencourt Rosa Leal

Sickle cell anemia (SCA) is a hemoglobinopathy characterized by hemolysis and vaso-occlusions caused by rigidly distorted red blood cells, genetically determined by homozygous hemoglobin S (HbSS). The SCA is associated with inflammatory conditions that may result from pro-adhesive and procoagulant phenotype and lead to the majority of deaths related to vascular occlusions. Extracellular nucleotides such as ATP, ADP, AMP and the adenosine nucleoside are important signaling molecules that are necessary for the maintenance and modulation of inflammatory reactions in the platelets and lymphocytes. They also act effectively in the regulation of vascular response from endothelial damage exerting effects on platelets. The extracellular levels of these nucleotides are physiologically controlled by the action of an enzyme complex formed by E-NTPDase, E-5'nucleotidase and E-ADA. These enzymes are located on the surface of platelets and lymphocytes with the aim of maintaining the normal hemostasis and preventing excessive platelet aggregation, as well as modulating inflammatory response. Thus, the function of this study was to evaluate the inflammatory profile, activity and expression of these ecto-enzymes in lymphocytes and platelets of patients with SCA. The results revealed a decrease in the TNF- $\alpha$  and IL-6 serum levels in SCA patients when compared to normal subject (control). Moreover, there were significant ( $P < 0.05$ ) elevations in E-NTPDase and E-ADA activities in lymphocytes and platelets of SCA patients when compared to the control. The increase on its activity leads to the maintenance of physiological levels of these nucleotides in the extracellular environment, preventing a greater tissue damage and inflammation, and preventing the thrombus formation by the balance of the ATP and ADP metabolism. Furthermore, a significant ( $P < 0.05$ ) decrease in the percentage of platelets expressing CD39 was observed in SCA patients, which may be directly related to the therapy used were these patients. In addition, no significant ( $P < 0.05$ ) differences were observed in the E-5'-nucleotidase enzyme activity and expression in SCA platelets and normal subjects. This study suggests that the decreased pro-inflammatory cytokine levels by use of hydroxyurea may have occurred in order to reduce the pro-inflammatory response and prevent vaso-occlusive crisis. Also, the increased E-NTPDase activity could be a compensatory mechanism associated with the low expression of CD39<sup>+</sup> in platelets. Also, the AMP formed may be converted to ADP by the action of adenylate kinase 1 (AK1) and this may be attributed to the altered platelet aggregation in SCA patients. The observed increase in ADA activity in SCA may be linked to the release of adenosine by endothelial cells, since high concentration of adenosine in the extracellular environment is detrimental to SCA. Besides, alteration of these enzymes activities may suggest that the purinergic system could be involved in the thromboregulatory process in SCA patients. We therefore conclude that the cytokine profile was modified and the extracellular regulation of nucleotides in response to hypoxia and inflammation by ecto-enzymes in SCA patients on chemotherapy.

**Keywords:** Sickle cell anemia. Lymphocytes. Platelets. Cytokines. Purinergic Signalling.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

### INTRODUÇÃO

- FIGURA 1** – Representação da estrutura quaternária da hemoglobina.....16
- FIGURA 2** – Síntese das diferentes cadeias globínicas ao longo da ontogenia humana.....17
- FIGURA 3** – Representação da estrutura da hemoglobina normal e hemoglobina S. Esquerda: hemoglobina normal, com o aminoácido ácido glutâmico na posição 6 da cadeia da  $\beta$ -globina. Direita: hemoglobina S, com o aminoácido valina na posição 6 da cadeia da  $\beta$ -globina.....18
- FIGURA 4** – Fisiopatologia da HbS.....20
- FIGURA 5** – Diagrama esquemático da condição patofisiológica da AF. Hemoglobina circulando livre no plasma impedindo a clivagem do fator de Von Willebrand e o acúmulo do mesmo no plasma causando vaso-oclusão.....21
- FIGURA 6** – Fenômeno da vaso-oclusão.....22
- FIGURA 7** – Representação dos componentes do sistema purinérgico.....25
- FIGURA 8** – Receptores envolvidos na resposta fisiológica dos nucleotídeos e nucleosídeos extracelulares de adenina.....27
- FIGURA 9** – Enzimas envolvidas na degradação extracelular de nucleotídeos e nucleosídeos de adenina.....28
- FIGURA 10** – Estrutura da ecto-5'-nucleotidase ancorada à membrana.....29
- FIGURA 11** – Principais vias envolvidas no metabolismo da adenosina.....31
- FIGURA 12** – Elevada concentração de 2,3-DPG por estimulação de elevada concentração de adenosina na condição de hipóxia leva a falcização dos eritrócitos.....32

### ARTIGO 1

- FIGURA 1** – ATP (A) and ADP (B) hydrolysis in lymphocytes of SCA and control patients. Enzyme specific activities are reported as nmol of Pi released/min/mg of protein. Variables were expressed as mean  $\pm$  standard error of the mean (SEM). Bars represent mean  $\pm$  S.E.M. (“\*\*\*\*”) Indicates a significant  $P < 0.001$ , with  $n = 30$  (controls) and  $n = 15$  (SCA) (Student’s t test for independent samples).....38
- FIGURA 2** – Adenosine desamination in lymphocytes of control and patients with SCA. Enzyme activity is reported as U/L. Variables were expressed as mean  $\pm$  standard error of the mean (SEM). Bars represent mean  $\pm$  S.E.M. (“\*\*\*\*”) Indicates a significant  $P < 0.001$ , with  $n = 30$  (controls) and  $n = 15$  (SCA) (Student’s t test for independent samples).....39
- FIGURA 3** – Serum levels of IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17, INF- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  from patients with SCA and control group. Bars represent mean  $\pm$  S.E.M. (“\*\*\*\*”) Indicates a significant  $P < 0.001$ ,  $n = 15$  (Student’s t test for independent samples).....40

**MANUSCRITO ACEITO**

- FIGURA 1** – ATP (A), ADP (B) and AMP (C) hydrolysis by platelets of SCA and control patients. Enzyme specific activities were reported as nmol of Pi released/min/mg of protein. Variables were expressed as mean ± standard error of the mean (SEM). Bars represent mean ± S.E.M. (“\*”) indicates a significant ( $P<0.05$ ) difference between the SCA patients (n=15) and control (n=30). (“\*\*”) indicates a significant ( $P<0.01$ ) difference between the SCA patients (n=15) and control (n=30). Student's *t* test for independent samples was used for all the analyses. ....64
- FIGURA 2** – Ecto-adenosine deamination by platelets of control and patients with SCA. Enzyme activities were reported as U/L. Variables were expressed as mean ± standard error of the mean (SEM). Bars represent mean ± S.E.M. (“\*”) indicates a significant  $P<0.05$ , with n=30 (controls) and n=15 (SCA) (Student's *t* test for independent samples.).....65
- FIGURA 3** – CD39 (A) and CD73 (B) expression on platelets were analyzed using flow cytometry in control and sickle cell disease groups. Data were gated on CD61/CD39 or CD61/CD73 plots. Bars graph summarizing mean ± S.E.M. (“\*\*”) indicates a significant  $P<0.01$ , with n=15 (controls) and n=15 (SCA) (Student's *t* test for independent samples.).....66

## LISTA DE TABELAS

### ARTIGO 1

<b>TABELA 1</b> – Hematological determination in patients with sickle cell anemia (SCA) and control group.....	38
<b>TABELA 2</b> – <i>In vitro</i> effects of HU and Folic Acid on E-NTPDase (ATP and ADP hydrolysis) and E-ADA activities in lymphocytes of SCA patients and control group.....	39

### MANUSCRITO ACEITO

<b>TABELA 1</b> – <i>In vitro</i> effects of HU and Folic Acid on E-NTPDase (ATP, ADP hydrolysis), E-5'-NT (AMP hydrolysis) and E-ADA activities in platelets of healthy subjects.....	63
--	----

## LISTA DE ANEXOS

<b>ANEXO A</b> – Parecer Consubstanciado do Comitê de Ética para Pesquisa com Seres Humanos.....	84
--	----

## LISTA DE ABREVIATURAS

ADAMTS	Desintegrina e metaloproteinase com domínios trombospondina
AF	Anemia falciforme
ATP	Adenosina trifosfato
ADP	Adenosina difosfato
AMP	Adenosina monofosfato
AVC	Acidente vascular cerebral
ENTs	Transportadores de nucleosídeos
fMLP	N-formyl-Met-Leu-Phe
FPR	Receptores do peptídeo formil
FWW (VWF)	Fator de Von Willebrand
Hb	Hemoglobina
HbA	Hemoglobina A
HbF	Hemoglobina fetal
HbS	Hemoglobina S
HU	Hidroxiuréia
IL	Interleucina
TNF- $\alpha$	Fator de necrose tumoral $\alpha$
RBC	Eritrócitos

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>15</b>
1.1	OBJETIVO .....	33
1.1.1	Objetivo Geral .....	33
1.1.2	Objetivos Específicos .....	33
<b>2</b>	<b>ARTIGO 1 - SICKLE CELL ANEMIA INDUCES CHANGES IN PERIPHERAL LYMPHOCYTES E-NTPDASE/E-ADA ACTIVITIES AND CYTOKINES SECRETION IN PATIENTS UNDER TREATMENT .....</b>	<b>35</b>
<b>3</b>	<b>MANUSCRITO ACEITO - ALTERED E-NTPDASE/E-ADA ACTIVITIES AND CD39 EXPRESSION IN PLATELETS OF SICKLE CELL ANEMIA PATIENTS.....</b>	<b>42</b>
<b>4</b>	<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>67</b>
<b>5</b>	<b>CONCLUSÕES .....</b>	<b>72</b>
<b>6</b>	<b>PERSPECTIVAS .....</b>	<b>73</b>
	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>74</b>
	<b>ANEXO .....</b>	<b>84</b>

## 1 INTRODUÇÃO

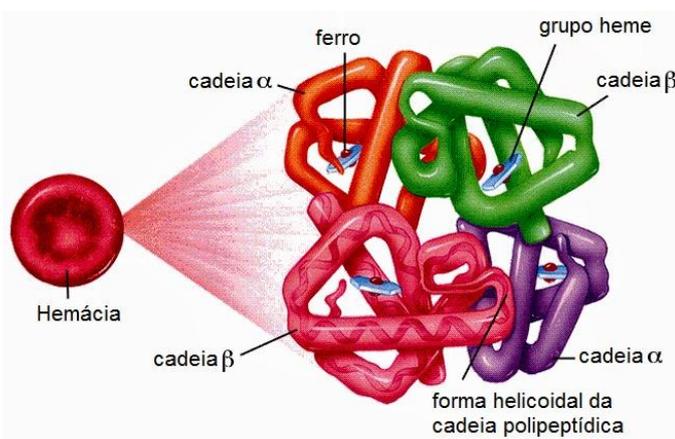
A Anemia Falciforme (AF) foi apresentada na literatura pela primeira vez em 1910 pelo médico inglês James Bryan Herrick, o qual observou eritrócitos alongados e em formato de foice na distensão sanguínea de um estudante negro originário da Jamaica. O mesmo apresentava um quadro anêmico grave acompanhado de icterícia, complicações pulmonares e úlceras de membros inferiores (VERNON, 2004). Em 1927, Hahn e Gillepsie descobriram que a falcização dos eritrócitos era dependente da baixa tensão de oxigênio. Já em 1947, Accioly, na Bahia, sugeriu que a falciformação ocorria em decorrência de uma herança autossômica recessiva, a qual foi confirmada em 1949 por Linus Pauling e colaboradores por meio de técnicas de eletroforese mediante identificação da HbS. Ingram, em 1956, elucidou a natureza bioquímica dessa doença quando, através de um processo de eletroforese bidimensional associada à cromatografia, fracionou a hemoglobina e estudou os seus peptídeos.

A mutação genética responsável por esta patologia surgiu há muitos séculos no continente Africano, podendo portanto ser encontrada em várias populações de diversas partes do mundo. A alta incidência da AF se encontra na África, Arábia Saudita e Índia. No Brasil, devido ao grande contingente da população africana desenraizada de seus países, esta doença se encontra muito presente, cuja população tem em sua base de constituição os povos africanos (BANDEIRA et al., 1999; SILLA, 1999).

As hemoglobinopatias constituem uma das principais e mais frequentes doenças genéticas que acometem os seres humanos e, dentre elas, AF é a doença hereditária mais prevalente no Brasil. De acordo com os dados do Programa Nacional de Triagem Neonatal, no Brasil, nascem cerca de 3.500 crianças por ano com doença falciforme ou 1/1.000 nascidos vivos e 200 mil portadores do traço falciforme, com tendência a atingir uma parcela cada vez mais significativa da população, devido ao alto grau de miscigenação em nosso país. No estado da Bahia há 1 falcêmico para cada 650 nascidos, no Rio de Janeiro esse índice é de 1/1.300, e nos estados de Minas Gerais e São Paulo é de 1/1.400 nascidos vivos (BRASIL, 2013). A incidência de nascidos vivos diagnosticados com a doença falciforme no estado do Rio Grande do Sul é de 1:11.000, enquanto que a incidência de nascidos vivos diagnosticados com traço falciforme é de 1:65.

O termo hemoglobinopatia refere-se a doenças genéticas que afetam a hemoglobina (Hb). A Hb é uma hemoproteína localizada no interior das hemácias dos mamíferos, cuja principal função é a absorção, transporte e distribuição do oxigênio para os diversos tecidos do

organismo. Possui uma estrutura globular e quaternária (Figura1), constituída de quatro subunidades iguais, duas a duas, composta por dois pares de cadeias polipeptídicas, sendo um par denominado de cadeias do tipo alfa (alfa ou zeta) e dois pares de cadeias do tipo não-alfa (beta, delta, gama ou épsilon). Cada subunidade é quimicamente unida a um grupo prostético contendo ferro ( $\text{Fe}^{+2}$ ), a ferroprotoporfirina IX (grupo heme), que detém a propriedade de receber, ligar e/ou liberar o oxigênio nos tecidos (BAIN, 2006; BUNN; FORGET, 1986; PERUTZ et al., 1960).

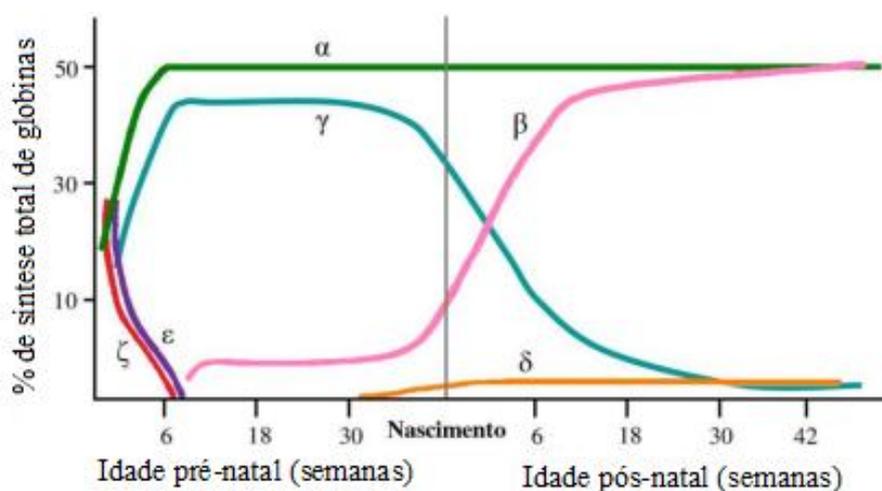


**Figura 1:** Representação da estrutura quaternária da hemoglobina mostrando as quatro cadeias polipeptídicas, duas cadeias alfa e duas cadeias beta. Cada cadeia polipeptídica contém um grupo prostético heme ao qual se liga o  $\text{O}_2$ . Disponível em <https://www.lume.ufrgs.br>. Data acesso: 24/02/2016.

As hemoglobinopatias são doenças genéticas caracterizadas por alterações na porção globínica da molécula de Hb, cujas alterações podem ser classificadas como estruturais ou de síntese. As alterações estruturais decorrem de mutações pontuais de uma ou mais bases que codificam os aminoácidos e incluem a substituição, deleção ou inserção de um ou mais aminoácidos, como também a fusão de duas cadeias globínicas diferentes causando a formação de uma Hb anormal (variante). Já as alterações de síntese (talassemias) caracterizam-se pela síntese reduzida ou nula de um ou mais tipos de cadeias globínicas (BUNN; FORGET, 1986; STEINBERG; NAGEL, 2001).

A síntese das cadeias globínicas é regulada por mecanismos genéticos, cujos genes estão localizados nos cromossomos 11 e 16 (GALIZA NETO; PITOMBEIRA, 2003). As diversas cadeias de proteínas combinam-se dando origem às diferentes hemoglobinas desde o período embrionário até a fase adulta. A produção das hemoglobinas embrionárias ocorre nos primeiros meses do início da evolução gestacional, sendo que em grande parte da vida intrauterina

prepondera a produção da hemoglobina fetal (HbF) ( $\alpha_2\gamma_2$ ). O gene da cadeia beta globínica é expresso, com pouca intensidade nas primeiras seis semanas de vida fetal, mas a partir deste período ocorre uma mudança, quando a síntese de cadeia gama é amplamente substituída pela síntese de cadeia beta, dando origem à produção da hemoglobina A (HbA) ( $\alpha_2\beta_2$ ), permanecendo presente por toda a fase adulta. A produção das cadeias delta tem seu início por volta da 30<sup>a</sup> semana da gestação em concentrações reduzidas permanecendo assim até o nascimento, e aumentando lentamente até sua estabilização por volta do sexto mês de vida em diante. Estas cadeias, quando ligadas às cadeias alfa, darão origem à hemoglobina A<sub>2</sub> (HbA<sub>2</sub>) ( $\alpha_2\delta_2$ ). A HbA<sub>2</sub> estará presente nos eritrócitos próximo dos seis meses iniciais de vida e por toda a fase adulta, sendo composta por dois pares de cadeias polipeptídicas (Figura 2) (DUCATTI et al., 2001).

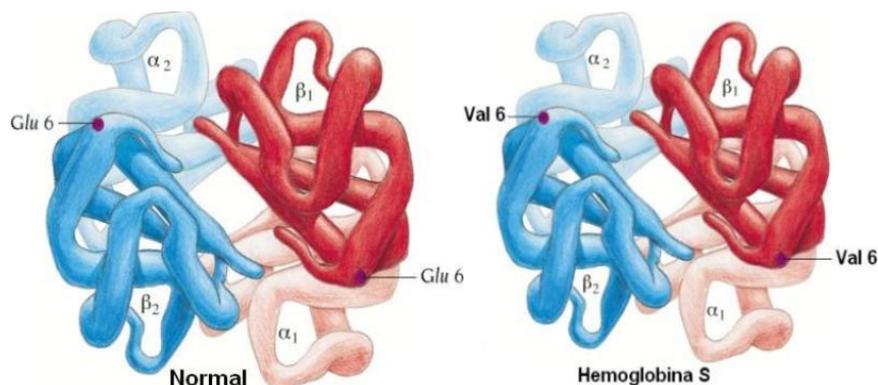


**Figura 2:** Síntese das diferentes cadeias globínicas ao longo da ontogenia humana. Adaptado de Weatherall; Clegg (1981).

As hemoglobinas HbA ( $\alpha_2\beta_2$ ), HbA<sub>2</sub> ( $\alpha_2\delta_2$ ) e HbF ( $\alpha_2\gamma_2$ ) são aquelas encontradas em indivíduos normais. Cada uma dessas frações tem concentrações bem definidas em cada fase do desenvolvimento, sendo que em adultos, os níveis de HbA variam de 96% a 98%; de 2,5% a 3,5% para a HbA<sub>2</sub> e de 0% a 1% para a HbF (XU et al., 2009).

As doenças falciformes englobam um grupo de anemias hemolíticas hereditárias que têm em comum a presença da hemoglobina S (HbS) nos eritrócitos. A HbS, quimicamente representada por  $\alpha_2^A \beta_2^S$ , é uma variante da Hb normal, a HbA  $\alpha_2^A \beta_2^A$ , e originada devido a uma mutação genética que afeta uma das bases nitrogenadas do DNA que compõe o gene que

sintetiza a globina beta (NAOUM, 2000). A HbS é originada quando no gene da globina beta há a substituição de uma base nitrogenada do códon normal GAG para GTG, resultando na substituição do sexto aminoácido da globina beta - o ácido glutâmico (GAG) – por outro aminoácido diferente - a valina (GTG) (Figura 3) (CHIRICO; PIALOUX, 2012; GUIMARÃES; COELHO, 2010; STEINBERG, 2008).



**Figura 3:** Representação da estrutura da hemoglobina normal e hemoglobina S. Esquerda: hemoglobina normal, com o aminoácido ácido glutâmico na posição 6 da cadeia da  $\beta$ -globina. Direita: hemoglobina S, com o aminoácido valina na posição 6 da cadeia da  $\beta$ -globina. Disponível em [www.hemoce.ce.gov.br](http://www.hemoce.ce.gov.br). Acessado em 23/02/2016.

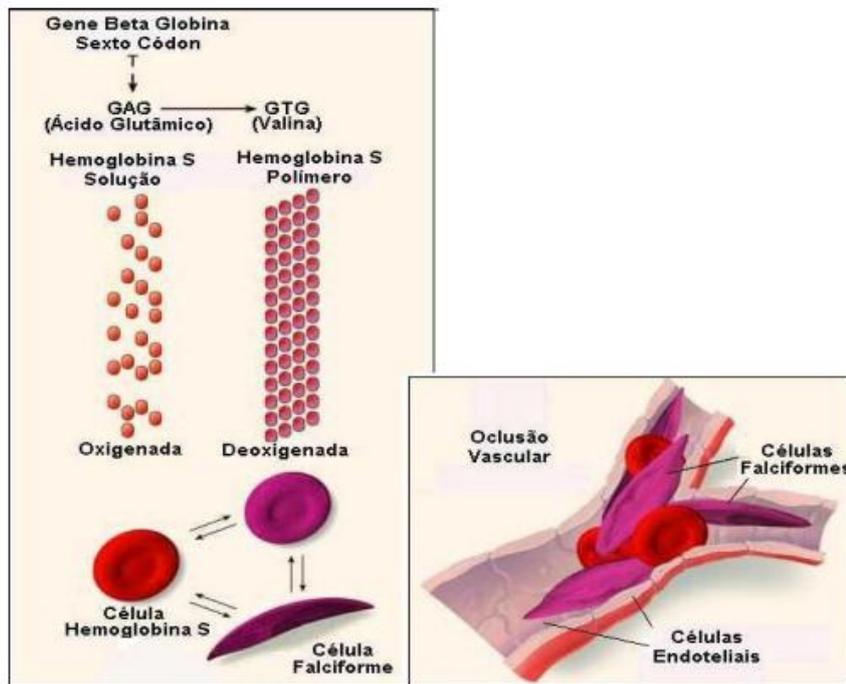
Inúmeras variantes de Hb já foram identificadas. Em sua maioria, resultam da substituição de um único aminoácido nas cadeias alfa ou beta globina e podem interferir na estabilidade ou nas propriedades funcionais da Hb (WEATHERALL; CLEG, 2001). As doenças falciformes são constituídas por vários genótipos com predomínio da HbS sobre outras hemoglobinas, com manifestações clínicas específicas e de intensidades variáveis. Os genótipos mais comuns que caracterizam as doenças falciformes são HbS/ $\beta$ talassemia, HbS/C, HbS/Persistência hereditária da Hb fetal e o genótipo HbS/S, o qual caracteriza a anemia falciforme (FRENETTE; ATWEH, 2007).

Geneticamente a AF é determinada pela homozigose da HbS (HbSS), além de ser a forma mais prevalente entre as doenças falciformes é a que apresenta maior gravidade clínica e hematológica (BANDEIRA et al., 2004; NAOUM, 2000; PELIZARO et al., 2012). O principal determinante da severidade da doença é a taxa e a extensão da polimerização da HbS. Por ser uma anomalia da globina beta, as características clínicas desta doença somente podem ser percebidas após a estabilização da produção das globinas, fato que ocorre por volta do sexto

mês de vida, quando a síntese da globina gama (atuante na fase fetal) é interrompida, enquanto que o gene beta sintetiza em sua plenitude globinas beta normais (NAOUM, 2000).

Nos indivíduos portadores do traço falciforme há a produção tanto de HbA quanto de HbS, o que resulta em um fenótipo normal. Estes indivíduos não apresentam a doença e nem possuem anormalidades na forma dos eritrócitos. Alguns estudos demonstraram um modesto aumento do fator VIII da coagulação e do fator de Von willebrand quando comparado a indivíduos com fenótipo HbAA, sugerindo um leve aumento no estado de hipercoagulabilidade destes pacientes, porém ainda não muito bem elucidado até o momento (FOLSOM et al., 2015; WESTERMAN et al., 2002).

Os eritrócitos cujo conteúdo predominante é a HbS, sofrem polimerização quando em condições de hipóxia (Figura 4) (COSTA, 2001; INÍGUEZ et al., 2003; SUN; XIA, 2013). A partir do momento em que a oxi-HbS perde o oxigênio e se torna desoxi-HbS, ocorre a formação de pontes de hidrogênio entre os aminoácidos valina da posição 1 da globina beta S, e a valina mutante que substituiu o ácido glutâmico. A formação dessas pontes de hidrogênio modifica a estrutura espacial da molécula de HbS e promove contatos intermoleculares com outros aminoácidos da globina beta S que participam da formação de agregados de filamentos (NAOUM, 1997; PELIZARO et al., 2012; STEINBERG, 1998; 2008). Como consequência, estes agregados de filamentos se polimerizam e alteram a estrutura globular da molécula de HbS, modificando também a morfologia discóide do eritrócito, causando o seu afoçamento. A forma característica de foice apresenta uma redução da flexibilidade, o que encurta a vida média destas células na circulação, provocando complicações clínicas e prejudicando o desenvolvimento, a qualidade de vida e até mesmo podendo levar o indivíduo ao óbito (CHIRICO; PIALOUX, 2012; ZAGO et al., 2004).



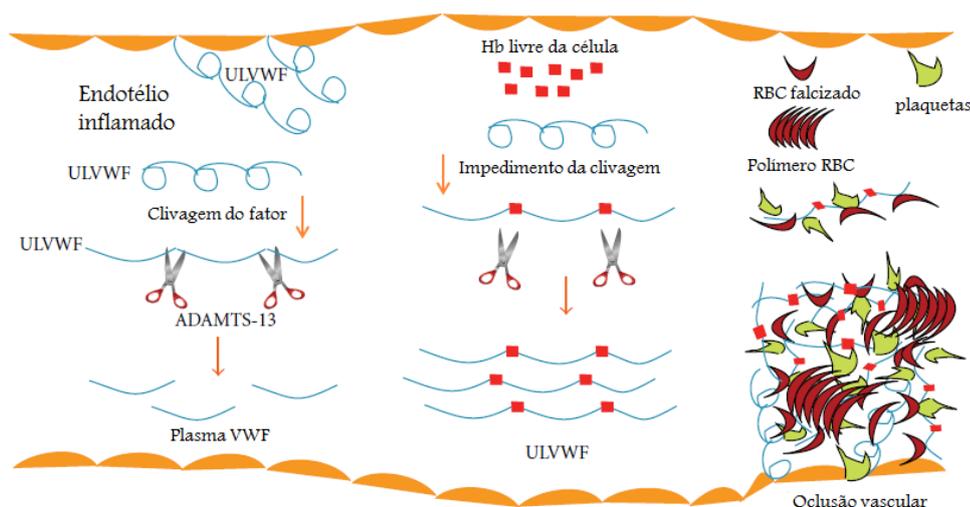
**Figura 4:** Fisiopatologia da HbS. Adaptado de Steinberg (1999).

A membrana eritrocitária é muito afetada durante a falcização, caracterizada por desarranjos das proteínas e geração de radicais livres oxidantes. A nível circulatório, a alteração da plasticidade normal dos eritrócitos desencadeada pelos efeitos polimerizantes da HbS tornam os eritrócitos falcêmicos com maior possibilidade de aderirem ao endotélio vascular (STEINBERG, 1998). Como consequência destas repetidas polimerizações da HbS, ocorre hemólise intravascular e crises vaso-oclusivas, desencadeando a geração de espécies reativas do oxigênio, redução da biodisponibilidade de óxido nítrico, lesão endotelial, aumento da expressão de moléculas de adesão de células sanguíneas e endoteliais, e um processo inflamatório crônico (CHIRICO; PIALOUX, 2012; REES; GIBSON, 2011; SUN; XIA, 2013).

O afoçamento dos eritrócitos é a característica marcante da AF, pois além de causar anemia hemolítica crônica, ainda é responsável pela obstrução de vasos sanguíneos com consequentes episódios dolorosos recorrentes, infarto e necrose dos ossos, articulações, e de órgãos como baço, pulmões, rins, dentre outros (PALLIS, 2011; ZAGO et al., 2004). Dentre outras intercorrências relevantes provocadas pela AF, podemos citar o acidente vascular cerebral, retinopatas proliferativas, retardo na maturação sexual, desenvolvimento de úlceras nas pernas, priapismo (ereção peniana persistente e dolorosa sem estímulo sexual), dentre outras (BODAS et al., 2013; KASSIM; DEBAUM, 2013; RIBEIRO et al., 2008). Esta patologia está

ainda associada com um estado de hipercoagulabilidade (DE FRANCESCHI et al., 2011; TOMER et al., 2001) e a um decréscimo nos níveis de proteínas anticoagulantes naturais, agravando-se ainda mais durante as crises vaso-oclusivas (ATAGA et al., 2008; WESTERMAN et al., 2002).

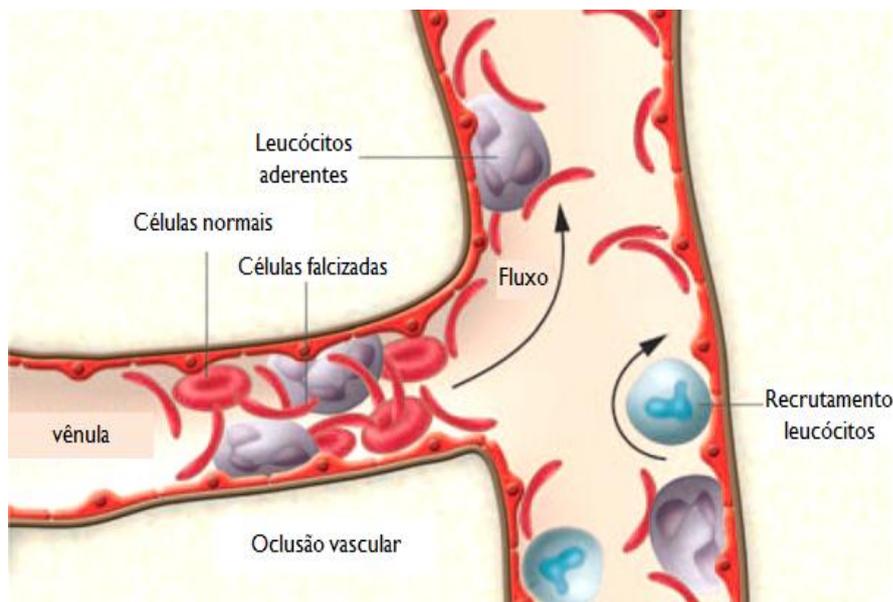
Sabe-se também que a AF pode estar associada a desarranjos no plasma e mecanismos homeostáticos celulares, os quais podem transmitir uma tendência trombogênica para essa patologia (YEE et al., 2005). Acredita-se que essas mudanças possam ser devido à sobrevivência reduzida das plaquetas e ao aumento nos níveis plasmáticos de ADP e epinefrina (STUART; SETTY, 2001). Além disso, altos níveis de trombina e pró-trombina têm sido relatados nestes pacientes (TOMER et al., 2001). Alguns estudos têm demonstrado níveis aumentados do fator de Von Willebrand (VWF) no plasma de pacientes com AF (SCHNOG et al., 2006; WICK et al., 1993; ZHOU et al., 2009). Em condições hemolíticas como acontece na AF, os eritrócitos liberam uma quantidade excessiva de Hb extracelular no plasma, a qual inibe a clivagem do VWF, uma proteína multimérica em circulação sanguínea com funções homeostáticas. Através do bloqueio da clivagem de VWF ocorre a ligação da Hb aos multímeros deste fator não clivados, os quais se acumulam no plasma promovendo adesão celular e eventos como trombose e oclusão vascular, uma vez que são hiperativos na ligação às plaquetas e às hemácias falciformes (Figura 5) (ZHOU et al., 2011).



**Figura 5:** Diagrama esquemático da condição patofisiológica da AF. Hemoglobina circulando livres no plasma impedindo a clivagem do fator de Von Willebrand e o acúmulo do mesmo no plasma causando vaso-oclusão. Adaptado de Zhou et al. (2011).

Na patologia falciforme, o bloqueio vascular pelos eritrócitos falcizados é a causa do processo inflamatório, assim como, a inflamação desencadeada mediante este bloqueio também é a causa da doença vascular, pois ambos ocorrem como um ciclo vicioso, com a inflamação e a oclusão vascular estimulando uma a outra reciprocamente (ESMON, 2005; REES et al., 2010). O processo inflamatório está frequentemente associado com a ativação da coagulação sanguínea, com desencadeamento da expressão anormal de moléculas de adesão, com consequente depleção do óxido nítrico e alteração na vasorregulação (CINEL; OPAL, 2009; HEBBEL, 2004; SUN; XIA, 2013).

As crises vaso-oclusivas dolorosas desencadeadas pelo aprisionamento dos eritrócitos e leucócitos na microcirculação levam à obstrução vascular e à isquemia tecidual (Figura 6). A oclusão vascular é o resultado da interação dinâmica entre os eritrócitos e o endotélio vascular, resultando em episódios de oclusão microvascular e isquemia, seguido pelo restabelecimento do fluxo sanguíneo, que, além disso, promove lesão tecidual mediada por reperfusão. Estes ciclos de isquemia e reperfusão ocasionam um processo inflamatório e de estresse oxidativo, aumentando a expressão de moléculas de adesão endotelial, um aumento na síntese de moléculas inflamatórias, causando também um quadro de leucocitose (BELCHER et al., 2003; FRENETTE, 2002).



**Figura 6:** Fenômeno da vaso-oclusão. Adaptado de Frenette; Atweh (2007).

Em termos laboratoriais, a contagem de reticulócitos encontra-se elevada na faixa de 10 a 20% nos pacientes com AF. O volume corpuscular médio (VCM) e a concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) encontram-se normais, porém a variação no tamanho das hemácias (RDW) é marcadamente observado e correlaciona-se com a gravidade da doença (BAIN, 2006; WEATHERALL et al., 2001).

De fato, a AF está associada a um estado inflamatório sistêmico e crônico, evidenciado por uma elevação crônica da contagem de leucócitos (ADRAGNA et al., 1994; STEINBERG, 2008), fenótipo ativado de células endoteliais circulantes (pró-adesivo, pró-coagulante e pró-oxidante), expressão aumentada dos receptores endoteliais como VCAM e P-selectina (HEBBEL et al., 2009).

Segundo Lanaro et al., (2009) resultados conflitantes têm sido notados, referentes aos níveis plasmáticos de citocinas nos pacientes com hemoglobinopatia. De acordo com Raghupathy et al., (2000) os níveis plasmáticos de IL-2 e IFN- $\gamma$  não mostraram-se alterados nos pacientes homozigotos para HbS, quando comparado com os controles. Quanto ao marcador IL-4 um aumento foi observado nos pacientes com AF. No estudo de Pathare et. al., (2004) níveis séricos de IL-1 $\beta$ , IL-6 e IFN- $\gamma$  encontraram-se aumentados nos pacientes com a doença falciforme quando comparado ao grupo controle, enquanto que os níveis de TNF- $\alpha$  e IL-2 não mostraram-se diferentes significativamente. Já para Lanaro et al., (2009), elevados níveis de mediadores inflamatórios tais como TNF- $\alpha$  e IL-8 foram observados nos pacientes com AF, porém naqueles pacientes que faziam uso da terapia com hidroxiuréia (HU), notou-se que os níveis de TNF- $\alpha$  retornaram aos seus níveis basais, e uma redução nos níveis de IL-10 foi observado.

Citocinas tais como IL-1 $\beta$ , IL-8, TNF- $\alpha$  são secretadas por plaquetas circulantes em estado ativado (LOPPNOW et al., 1998; SU et al., 1996). Além disso, essas citocinas inflamatórias são também produzidas por monócitos e macrófagos presentes no local da isquemia tecidual. Segundo Zennadi et al. (2008), os neutrófilos, monócitos e linfócitos também podem contribuir para a patofisiologia da AF. A aderência destas células ao endotélio vascular podem induzir a produção de múltiplas citocinas e estimular o endotélio vascular a aumentar a expressão de ligantes de moléculas de adesão para células sanguíneas.

É provável que outros mecanismos também desencadeiem uma resposta inflamatória, como por exemplo o meio ambiente hipóxico, que na microcirculação poderia desencadear um aumento na auto-oxidação da hemoglobina, levando a uma elevação na produção de superóxido

pelos eritrócitos. A consequente liberação de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pelos glóbulos vermelhos difundindo-se pelo endotélio levaria assim ao recrutamento de leucócitos (KIEFMANN et al., 2008).

A hidroxiuréia (HU) é o único fármaco disponível e aprovado pelo FDA para o tratamento da AF, sendo considerado o fármaco terapêutico para o controle das complicações clínicas (BRASIL, 2012). A HU possui um radical que, ao ser metabolizado, gera a produção de óxido nítrico, o qual estimula diretamente a produção de cadeias  $\gamma$  globina, aumentando, conseqüentemente, os níveis de HbF (PLATT, 2008). De acordo com Smith et al. (2011), o início da resposta ao tratamento com HU dá-se em cerca de 10 semanas de uso, incluindo alterações nas hemácias e nos índices de reticulócitos, além do aumento dos níveis de HbF. A HU promove a redução da hemólise e de crises vaso-oclusivas, diminuindo a necessidade de transfusão sanguínea e o risco de óbito (GREEN; BARRAL, 2014).

Em um estudo conduzido por Finnegan et al. (2007), foi observado que os polimorfonucleares de indivíduos tratados com HU aderem menos às células endoteliais e, conseqüentemente, capturam menos eritrócitos comparados a indivíduos sem uso de HU. Já Haynes et al. (2008) observaram que os neutrófilos ativados, dos pacientes com AF, apresentam um aumento na exposição de fosfatidilserina presente nas células vermelhas, o que facilita sua adesão ao endotélio vascular, no entanto, a HU também mostrou-se capaz de atenuar esse processo.

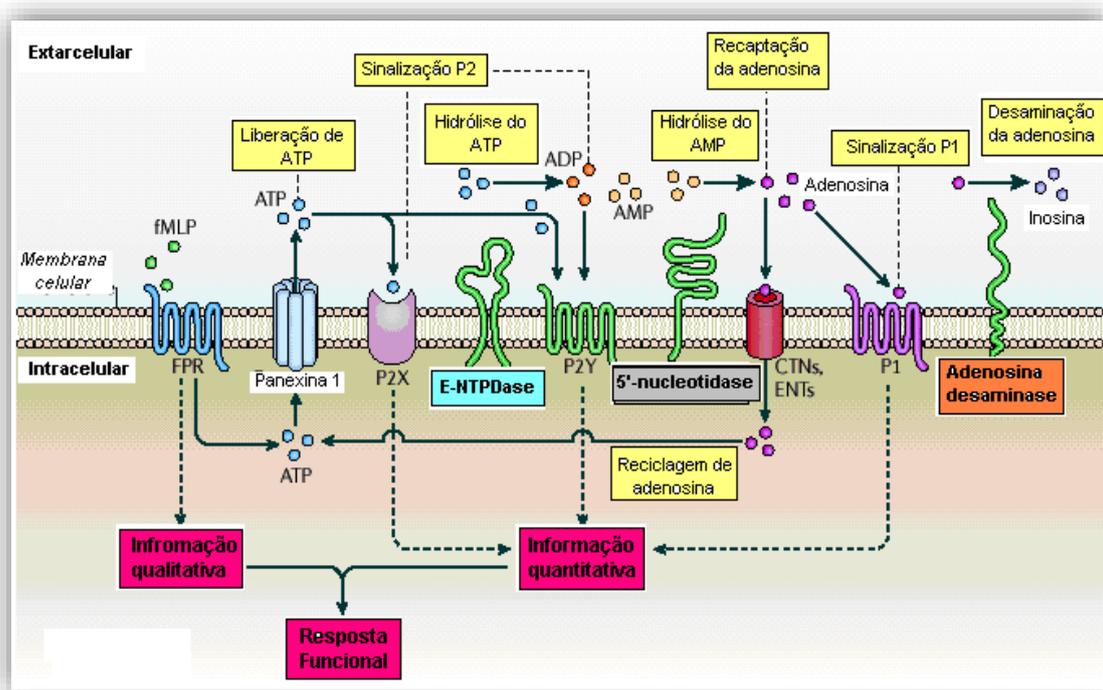
O único porém de seu uso é que a mesma promove o desenvolvimento de macrocitose, dificultando o reconhecimento da deficiência de ácido fólico, portanto o uso HU é aconselhado concomitantemente com o uso de ácido fólico como medida profilática (CANÇADO et al., 2009). Outro recurso terapêutico destes pacientes é o transplante de células tronco hematopoiético, único tratamento capaz de curar o doente falciforme, com o objetivo de restabelecer a hematopoiese normal do indivíduo (FERRAZ et al., 2012).

A hipóxia desempenha um papel crítico nos sujeitos portadores da HbS/S, promovendo a falcização dos eritrócitos com consequente extravasamento de Hb e do nucleotídeo adenosina trifosfato (ATP) na circulação (SUN; XIA, 2013). Os nucleotídeos da adenina, tais como ATP, ADP (adenosina difosfato) e AMP (adenosina monofosfato), e seu derivado nucleosídeo adenosina, são secretados por leucócitos, plaquetas e células endoteliais danificadas sinalizando vias de grande importância que medeiam diversos efeitos biológicos (RALEVIC; BURNSTOCK, 1998). Estes nucleotídeos extracelulares são importantes moléculas sinalizadoras e essenciais para o início e manutenção das reações inflamatórias. Além disso,

são também efetivos na regulação da resposta vascular ao dano endotelial por exercerem diversos efeitos nas plaquetas (BIRK et al., 2002).

Os nucleosídeos são moléculas resultantes da união de uma base nitrogenada (púrica ou pirimídica) a uma pentose. Quando estes nucleosídeos são fosforilados por quinases específicas formam moléculas denominadas de nucleotídeos (ATKINSON et al., 2006). Em condições fisiológicas, os nucleotídeos e o nucleosídeo adenosina encontram-se em baixas concentrações no meio extracelular, normalmente em quantidades nanomolares, podendo chegar até as quantidades micromolares em determinadas situações (DI VIRGILIO et al., 2001). Quando em altas concentrações (ATP), pode atuar como molécula citotóxica e levar à morte celular, pela formação de grandes poros na membrana plasmática (PODACK et al., 1985; YOUNG et al., 1986).

O sistema purinérgico é composto por três principais componentes: os nucleotídeos e nucleosídeos extracelulares, os quais são os mediadores da sinalização; os receptores, através dos quais estes nucleotídeos e nucleosídeos exercem seus efeitos e, as ectoenzimas, responsáveis pelo controle dos níveis extracelulares destas moléculas (Figura 7) (YEGUTKIN, 2008). Este sistema é caracterizado por ser uma via de sinalização importante em diversos tecidos, desencadeando múltiplos efeitos celulares, na resposta imune, na inflamação, na dor, na agregação plaquetária, na proliferação e morte celular (BURNSTOCK; KNIGHT, 2004).



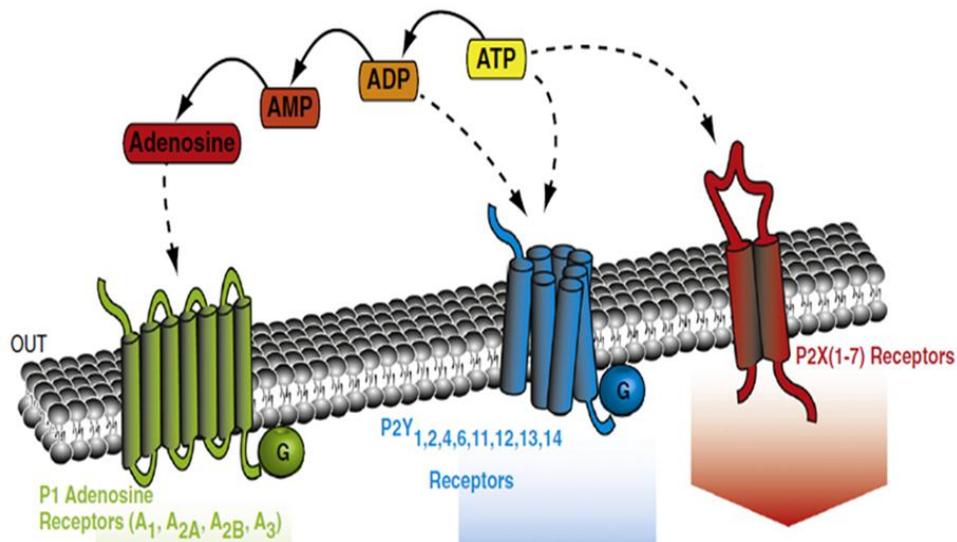
**Figura 7:** Representação dos componentes do sistema purinérgico. Adaptado de JUNGER (2011).

O ATP é capaz de estimular a produção de citocinas inflamatórias como IL-1 e TNF- $\alpha$  e ainda estimular a proliferação de linfócitos (BOURS et al., 2006). O ATP também exerce efeitos na tromborregulação, pois é liberado dos grânulos plaquetários, juntamente com o ADP, no momento que ocorre a ativação das plaquetas (SOSLAU; YOUNGPRAPAKORN, 1997).

O ADP não possui um papel definido nos linfócitos (DI VIRGILIO et al., 2001). Porém, nas plaquetas, ele age como um importante mediador da agregação plaquetária e da tromborregulação, podendo ser liberado na circulação sanguínea após danos teciduais (ZIMMERMANN, 1999). Em situações de disfunção ou dano vascular, o ADP é liberado do interior de grânulos existentes nas plaquetas, sendo então considerado o agonista mais importante do recrutamento plaquetário e o indutor da formação de trombos no interior de vasos (MARCUS et al., 2003).

Já o AMP é um metabólito intermediário da hidrólise do ATP (BARSOTTI; IPATA, 2004) que exerce a função de sinalizador em situações de desequilíbrio no metabolismo, servindo também como substrato para a formação da adenosina (CUNHA, 2001; LATINI; PEDATA, 2001). A adenosina é reconhecida por possuir propriedades anti-inflamatórias (CRONSTEIN, 1994), vasodilatadoras (JACOBSON et al., 2006), e imunossupressoras (SPYCHALA et al., 1997), além de atuar como um potente inibidor da agregação plaquetária (BOROWIEC et al., 2006).

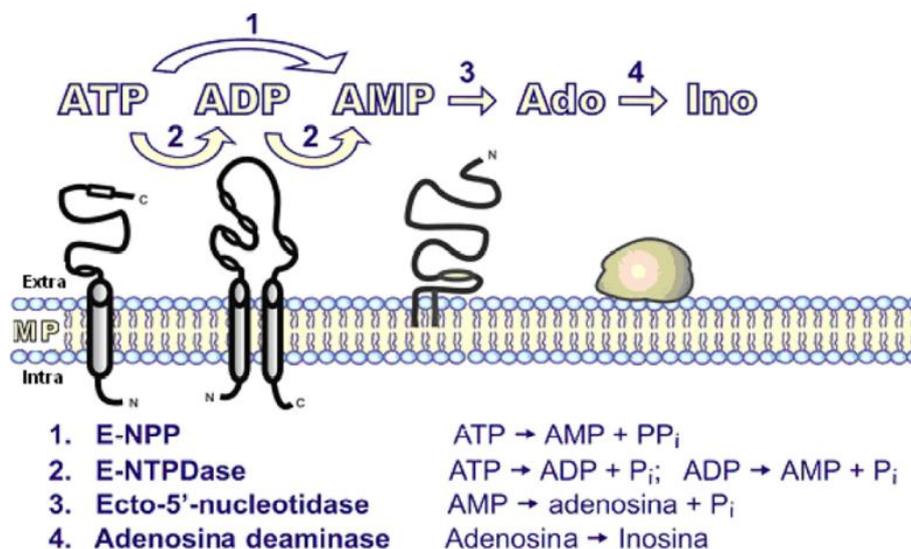
Os nucleotídeos extracelulares não atravessam a membrana plasmática, mas exercem suas ações biológicas através de receptores específicos presentes na superfície celular, denominados receptores purinérgicos (DI VIRGÍLIO et al., 2001). O ATP extracelular e seus metabólitos são reconhecidos por duas famílias de receptores purinérgicos, P1 e P2, presentes na superfície de diversas células cujos membros são ativados pela adenosina e por ATP e ADP, respectivamente (BURNSTOCK, 2007). Os purinoreceptores P2 podem ainda ser divididos em duas subclasses: acoplados à proteína G (metabotrópicos), chamados de P2Y e os ligados a canais iônicos, designados P2X (Figura 8) (DI VIRGÍLIO et al., 2001).



**Figura 8:** Receptores envolvidos na resposta fisiológica dos nucleotídeos e nucleosídeos extracelulares de adenina (<http://ars.sciencedirect.com/content/image/1-s2.0-S0005273612000065-gr1.jpg>). Data de acesso: 26/02/2016.

A liberação de grande quantidade de ATP intracelular durante o processo inflamatório aumenta a sinalização purinérgica através da ativação do receptor P2X7 desencadeando eventos pró-inflamatórios. A liberação da principal citocina, a IL-1 $\beta$ , durante o processo inflamatório, está associada com a atividade do receptor P2X7 (LISTER et al., 2007). Estudos relacionando a ativação do receptor P2X7 e a liberação e ativação de outras citocinas como IL-1 $\alpha$ , IL-2, IL-4, IL-6, IL-13, IL-18 e TNF- $\alpha$  também têm sido descritos (JACOB et al., 2013; LOOMIS et al., 2003; MEHTA et al., 2001; SMITH et al., 2001).

O controle dos níveis extracelulares dos nucleotídeos da adenina e da adenosina, bem como a consequente sinalização purinérgica por eles induzida através dos receptores, é fundamental na manutenção dos processos fisiológicos (ROBSON et al., 2006). Este controle é realizado por uma variedade de enzimas ancoradas à superfície celular ou localizadas no meio intersticial de forma solúvel (ZIMMERMANN et al., 2007). Tais enzimas são conhecidas como ectonucleotidases e podem ser classificadas como E-NTPDase (nucleosídeo trifostato 5'-difosfohidrolase ou apirase; EC 3.6.1.5), E-NPP (ecto-nucleotídeo pirofosfatase/fosfodiesterase; EC 3.1.4.1) e E-5'-nucleotidase (EC 3.1.3.5) sendo amplamente distribuídas nos tecidos (Figura 9) (ZIMMERMANN, 2000; 2012). Outra ectoenzima também importante no metabolismo purinérgico é a adenosina deaminase (E-ADA; EC 3.5.4.4), responsável pela desaminação do nucleosídeo adenosina (ZIMMERMANN, 2001; 2012).



**Figura 9:** Enzimas envolvidas na degradação extracelular de nucleotídeos e nucleosídeos de adenina. Adaptado de Yegutkin (2008).

Estas enzimas atuam formando uma cadeia enzimática que tem início com a ação da E-NTPDase e da E-NPP, as quais catalisam a hidrólise do ATP e do ADP, formando AMP. A seguir a enzima E-5'-nucleotidase hidrolisa a molécula do AMP formando adenosina (GODING, 2000; ZIMMERMANN, 2001). Ainda, seguindo a sequência de degradação dos nucleotídeos, a enzima E-ADA regula as concentrações de adenosina, através da formação de inosina (BOURS et al., 2006; ZIMMERMANN, 2000).

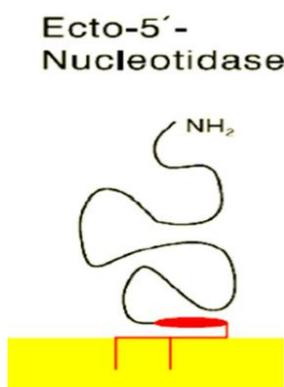
As NTPDases são uma família de enzimas responsáveis pela hidrólise de nucleotídeos di e trifosfatados a seus monofosfonucleotídeos correspondentes (ZIMMERMANN et al., 2012). As enzimas da família das NTPDases são expressas pelos genes ENTPD, sendo que oito membros desta família já foram identificados e diferem quanto a especificidade de substratos, distribuição tecidual e localização celular (BIGONNESSE et al., 2004; SHI et al., 2001; ZIMMERMANN, 2001). Quatro destes membros estão localizados na membrana celular com o sítio catalítico voltado para o meio extracelular (NTPDase 1, 2, 3, 8) e requerem Ca<sup>2+</sup> ou Mg<sup>2+</sup> para sua máxima atividade, sendo inativas na ausência destes cátions; e quatro exibem uma localização intracelular (NTPDase 4,5,6,7) (KUKULSKI et al., 2005; ROBSON et al., 2006; ZIMMERMANN, 2001).

Vários estudos têm mostrado uma atividade alterada da enzima E-NTPDase em pacientes com diferentes condições patológicas como o diabetes (LUNKES et al, 2003), a esclerose múltipla (SPANVELLO et al., 2010), o infarto agudo do miocárdio (BAGATINI et

al., 2008), e na síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS) (LEAL et al., 2005). A primeira a ser identificada e descrita foi a NTPDase-1, como proteína CD39 em células linfóides, representando um marcador de ativação de linfócitos B (MALISZEWSKI et al., 1994). Subsequentemente, também foi identificada em linfócitos NK, linfócitos T ativados, monócitos, assim como em células dendríticas e plaquetas (ATKINSON et al., 2006; FAVALORO, 1993; GODING, 2000; KANSAS et al., 1991; ROBSON et al., 2006). No sistema vascular, a NTPDase-1 desempenha um papel importante no sistema hemostático, uma vez que ela controla os efeitos pró-trombóticos e pró-inflamatórios de nucleotídeos como o ATP e o ADP, prevenindo assim a formação de coágulos e a vaso-oclusão (YEGUTKIN, 2008).

A NTPDase-2, é particularmente associada com as superfícies adventícias dos vasos (ROBSON et al., 2005) e células do sistema nervoso central e periférico (ROBSON et al., 2006). A enzima presente no sistema vascular pode regular ou inibir a agregação plaquetária induzida pelo ADP ou ATP (YEGUTKIN, 2008). Destaca-se por uma atividade hidrolítica preferencialmente à nucleosídeos trifosfatados, podendo induzir consequentemente ativação plaquetária por hidrolisar o ATP a ADP, e desfosforilar o ADP a AMP muito lentamente (KUKULSKI et al., 2005; ZIMMERMANN, 2001).

Por sua vez, a enzima E-5' nucleotidase (eN, CD73, E.C. 3.1.3.5) é responsável pela desfosforilação de ribo- e desoxirribonucleossídeos 5' monofosfatados como AMP, CMP, UMP, IMP e GMP, porém com uma maior afinidade pelo AMP, sendo por isto considerada a principal enzima responsável pela formação de adenosina (ZIMMERMANN et al., 2012). A eN é uma proteína ancorada à membrana plasmática via um glicosil fosfatidilinositol (GPI) com seu sítio catalítico voltado para o meio extracelular (Figura 10) (HUNSUCKER et al., 2005; ZIMMERMANN, 2001). Ela é amplamente encontrada em uma variedade de tecidos, como no endotélio vascular, plaquetas e células do sistema imune (COLGAN et al., 2006).



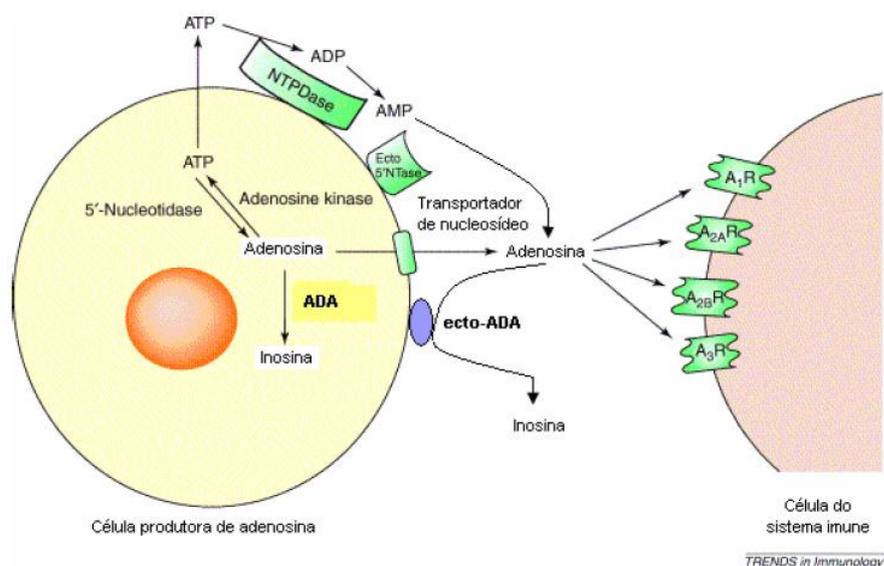
**Figura 10:** Estrutura da ecto-5' nucleotidase ancorada à membrana plasmática. Adaptado de ZIMMERMANN (2001).

A enzima adenosina desaminase também faz parte do conjunto de enzimas responsáveis pela degradação sequencial dos nucleotídeos e nucleosídeos da adenina (YEGUTKIN, 2008). A E-ADA é responsável pela desaminação irreversível da adenosina e 2'-deoxiadenosina em inosina e 2'-deoxinosina, respectivamente (RESTA et al., 1998; ROBSON et al., 2006). Esta enzima é encontrada em praticamente todos os vertebrados.

Em humanos existe na forma de duas isoenzimas classificadas como ADA1 e ADA2, cada uma com suas particulares propriedades bioquímicas (SHAROYAN et al., 2006). A ADA1 é uma isoenzima encontrada em todas as células e tecidos humanos, cuja localização é principalmente citosólica. Apresenta alta atividade em linfócitos e monócitos, sendo que quase toda atividade da ADA humana é atribuída a esta isoenzima (ZAVIALOV; ENGSTROM, 2005). Além disso, apesar de sua localização intracelular, ADA1 pode estar combinada com uma proteína combinante, formando um complexo que constitui uma ecto-ADA, localizada na superfície celular (TSUBOI et al., 1995).

Já a ADA2 apresenta diferenças tanto estruturais quanto cinéticas e é encontrada predominantemente no soro de indivíduos normais (UNGERER et al., 1992). Dados recentes têm sugerido que ADA2 no plasma humano pode ser secretada por monócitos ativados em processos inflamatórios, tendo a habilidade de regular a proliferação celular (IWAKI-EGAWA et al., 2006).

A regulação da concentração da adenosina extracelular, foi uma das primeiras funções fisiológicas atribuídas à ecto-ADA, logo após sua descoberta na membrana celular (FRANCO et al., 1997). A adenosina pode ser liberada pelas células, como também pode ser proveniente da degradação do ATP extracelular pela ação das ecto-nucleotidases. O controle da sinalização adenosinérgica também pode ser exercido através da via de recuperação da adenosina através de transportadores de nucleosídeos, seguida por fosforilação à AMP pela adenosina quinase ou desaminação à inosina pela ecto-ADA (Figura 11) (HASKÓ; CRONSTEIN, 2004).

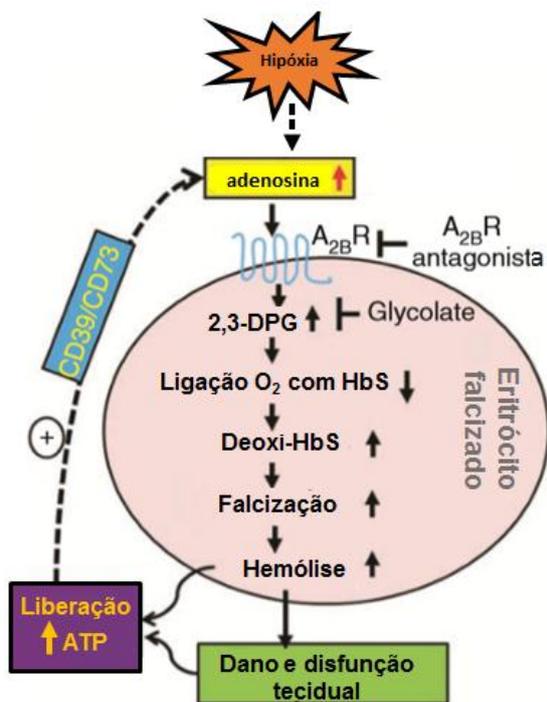


**Figura 11:** Principais vias envolvidas no metabolismo da adenosina. Adaptado de HASKÓ; CRONSTEIN (2004).

A ecto-ADA por ser principalmente encontrada em linfócitos de sangue periférico de humanos, desempenha um papel chave no sistema imune, uma vez que está diretamente relacionada com a proliferação, a maturação e a função destas células (GORELL et al., 2001). Além de maior porcentagem de células B expressarem ADA na sua superfície, o número de moléculas de ADA na membrana plasmática das células B é muito maior do que das células T, entretanto, a atividade enzimática da ecto-ADA é muito maior em células T do que em células B. Portanto, alterações na atividade da ecto-ADA podem ocorrer como consequência da variação em sua expressão em tecidos e células (ARAN et al., 1991; FRANCO et al., 1997).

As ações da adenosina são exercidas através de um grupo de receptores metabotrópicos classificados como ADORA1, ADORA2A, ADORA2B e ADORA3, no entanto somente os receptores ADORA2B são regulados positivamente nos casos de hipóxia (ELTZSCHIG et al., 2003; KONG et al., 2006). A elevada concentração de adenosina no meio extracelular leva à estimulação dos receptores ADORA2B promovendo a falcização dos eritrócitos por induzir a produção de 2,3-difosfoglicerato (2,3-DPG). Tanto a concentração de adenosina quanto a de 2,3-DPG encontram-se elevadas nos pacientes com AF. A 2,3-DPG é um metabólito específico dos eritrócitos que reduz a afinidade do oxigênio pela hemoglobina (NARITA et al., 1981; SASAKI; CHIBA, 1983). A adenosina regula a produção de 2,3-DPG nos eritrócitos controlando a afinidade do oxigênio pela hemoglobina. Entretanto, nos pacientes com AF esse mecanismo se torna prejudicial por reduzir a afinidade do oxigênio com a HbS fazendo com

que facilite o aumento da polimerização da deoxi-HbS e consequentemente a indução da falcização dos eritrócitos (Figura 12) (ZHANG et al., 2011).



**Figura 12:** Elevada concentração de 2,3-DPG por estimulação de elevada concentração de adenosina na condição de hipóxia leva a falcização dos eritrócitos. Adaptado de Zhang et al. (2011).

Com base no acima mencionado, o sistema purinérgico desempenha função importante na manutenção da homeostasia prevenindo excessiva agregação plaquetária e estando relacionado à resposta imune e inflamatória. Portanto é de interesse científico avaliarmos a sinalização purinérgica em pacientes com AF, já que esta doença é caracterizada pela falcização e aprisionamento dos eritrócitos na microcirculação levando ao desenvolvimento de um processo inflamatório e desencadeamento de processos vaso-oclusivos

## 1.1 OBJETIVOS

### 1.1.1 Objetivo geral

O objetivo do presente estudo foi avaliar a sinalização purinérgica em plaquetas e linfócitos de pacientes com anemia falciforme, como também investigar a modulação da resposta imune frente a esta patologia.

### 1.1.2 Objetivos específicos

- Avaliar a atividade das enzimas E-NTPDase e E-ADA em linfócitos de pacientes com AF.
- Avaliar a atividade das enzimas E-NTPDase, E-5'-nucleotidase e E-ADA em plaquetas de pacientes com AF.
- Verificar o efeito *in vitro* dos fármacos Hidroxiuréia e Ácido fólico sobre a atividade das enzimas E-NTPDase, E-5'-nucleotidase e E-ADA em linfócitos e plaquetas;
- Determinar a expressão de CD39 e CD73 em plaquetas;
- Determinar os níveis séricos de citocinas referentes às respostas Th1, Th2 e Th17.

## APRESENTAÇÃO

Os resultados desta tese estão apresentados sob a forma de um artigo publicado e um manuscrito aceito, os quais encontram-se nos itens “**ARTIGO e MANUSCRITO ACEITO**”. As seções Materiais e Métodos, Resultados, Discussão e Referências encontram-se nos próprios artigos e representam a íntegra deste estudo.

Os itens **DISCUSSÃO** e **CONCLUSÕES**, encontrados no final desta tese, apresentam interpretações e comentários gerais a respeito dos resultados apresentados nos artigos. As **REFERÊNCIAS** referem-se somente às citações que aparecem nos itens **INTRODUÇÃO** e **DISCUSSÃO** desta tese.

**2 ARTIGO 1**

**Anemia falciforme induz alterações na atividade da E-NTPDase/E-ADA em linfócitos periféricos e na secreção de citocinas em pacientes sob tratamento**

**Sickle cell anemia induces changes in peripheral lymphocytes E-NTPDase/E-ADA activities and cytokines secretion in patients under treatment**

Lívia G. Castilhos, Pedro H. Doleski, Tatiana M.D. Bertoldo, Daniela F. Passos, Claudia de M. Bertoncheli, João F.P. Rezer, Josiane B. Schlemmer, Daniela B.R. Leal.

**Publicado na revista “Biomedicine & Pharmacotherapy”**



Available online at  
**ScienceDirect**  
 www.sciencedirect.com

Elsevier Masson France  
**EM|consulte**  
 www.em-consulte.com/en



## Original Article

## Sickle cell anemia induces changes in peripheral lymphocytes E-NTPDase/E-ADA activities and cytokines secretion in patients under treatment



Lívia G. Castilhos<sup>a,h,\*</sup>, Pedro H. Doleski<sup>a</sup>, Tatiana M.D. Bertoldo<sup>a,b</sup>, Daniela F. Passos<sup>a</sup>,  
 Claudia de M. Bertoncheli<sup>a,b</sup>, João F.P. Rezer<sup>a,b</sup>, Josiane B. Schlemmer<sup>a</sup>, Daniela B.R. Leal<sup>a,h,\*</sup>

<sup>a</sup> Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria, Av. Roraima, 97105-900,

Santa Maria-RS, Brazil

<sup>b</sup> Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria, Av. Roraima, 97105-900,

Santa Maria-RS, Brazil

## ARTICLE INFO

Article history:  
 Received 9 May 2015  
 Accepted 22 May 2015

Keywords:  
 Sickle cell anemia  
 E-NTPDase  
 E-ADA  
 Cytokines

## ABSTRACT

Sickle cell anemia (SCA) is characterized by hemoglobin polymerization that results in sickle-shaped red blood cells. The vascular obstruction by sickle erythrocytes is often inflammatory, and purinergic system ecto-enzymes play an important role in modulating the inflammatory and immune response. This study aimed to evaluate the E-NTPDase and E-ADA activities in lymphocytes of SCA treated patients, as well as verify the cytokine profile in this population. Fifteen SCA treated patients and 30 health subjects (control group) were selected. The peripheral lymphocytes were isolated and E-NTPDase and E-ADA activities were determined. Serum was separated from clot formation for the cytokines quantification. E-NTPDase (ATP and ADP as substrate) and E-ADA (adenosine as substrate) activities were increased in lymphocytes from SCA patients ( $P < 0.001$ ). The TNF- $\alpha$  and IL-6 serum cytokines showed decreased on SCA patients comparing to control ( $P < 0.001$ ). The regulation of extracellular nucleotides released in response to hypoxia and inflammation through E-NTPDase and E-ADA enzymes represent an important control of purine-mediated in the SCA disease, avoiding elevated adenosine levels in the extracellular medium and consequent organ injuries in these patients. The pro-inflammatory cytokines decreased levels by use of hydroxyurea occur in attempt to reduce the pro-inflammatory response and prevent vaso-occlusive crisis.  
 © 2015 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

## 1. Introduction

Homozygous sickle cell anemia (SCA) is an autosomal recessive chronic hemoglobinopathy characterized by abnormal globin chain of hemoglobin content of the red blood cells (RBC) which result into a sickle shapes, attraction of RBCs to each other, and polymerization in a low oxygen environment. The molecular alteration of the sickle hemoglobin is a point mutation (GAG-GTG) in exon 1 of the  $\beta$  globin gene resulting in the substitution of glutamic acid by valine [1].

Two major pathophysiological processes drive the manifestations of this disease: vaso-occlusion with ischemia-reperfusion

injury and hemolytic anemia. Acute vaso-occlusive pain is caused by entrapment of erythrocytes and leucocytes in the microcirculation, causing vascular obstruction and tissue ischemia. Although this process requires HbS polymerization, the event that triggers the vascular obstruction by sickle erythrocytes is often inflammatory [2].

Inflammatory mechanisms play a major role in the pathobiology of sickle cell disease (SCD) [3]. Ischemia and reperfusion injury with resultant activation of inflammatory cells has been implicated as an important contributor to the pathophysiology and disease mechanism of vascular occlusion during sickle cell disease [4]. The lymphocytes may also be important in the vascular pathology of SCD and they are all involved in leukocyte-RBC adhesion. In fact, T-lymphocyte responses appear to be the most altered in SCD [5].

Ischemic events produced by the occlusion of both large and small blood vessels are stressful and involve intricate interactions between red blood cells, the endothelium, and leukocytes [6]. The

\* Corresponding authors at: Departamento de Microbiologia e Parasitologia/CCS/ UFSM, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM) Prédio 20 – Sala 4102.

Tel: +55 55 3220 9581.

E-mail addresses: liviagc@uems.br (L.G. Castilhos), daniela.leal@ufsm.br (D.B.R. Leal).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.biopha.2015.05.011>

0753-3322/© 2015 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

T cells, subdivided based on their associated cytokines, play a crucial role in inflammatory responses, and the balance of cytokine responses is believed to play an important role in coordinating an effective immune response, even under inflammatory conditions [7].

Pathologic conditions such as inflammation and ischemia are associated with the extracellular release of nucleotides, particularly of ATP and ADP [8]. In response of that, ATP is released from intracellular storage pools into the extracellular compartment from cells and converted to adenosine (ADO), increasing the extracellular adenosine levels from nanomolar range up to millimolar range [9]. This ADO production is increased and mediated by two sequential enzymes, E-NTPDase (CD39) and 5'-NT nucleotidase (CD73). E-NTPDase, a member of the ectonucleotide triphosphate diphosphohydrolase family, converts ATP and ADP into 5'-AMP, whereas 5'NT, converts 5'-AMP into ADO [10]. ADO levels are controlled by ADO kinase (AK), which rephosphorylates ADO, and by ADA, which converts ADO into inosine [11].

Considering that triggers the vascular obstruction by sickle erythrocytes is often inflammatory, and the purinergic system ecto-enzymes play an important role in modulating the inflammatory and immune response lymphocytes, it is extremely relevant to evaluate the E-NTPDase and E-ADA in lymphocytes of SCA treated patients, as well as the hematological parameters and cytokine profile.

## 2. Material and methods

### 2.1. Chemicals

The substrates ATP, ADP, adenosine, as well as Trizma base, Coomassie Brilliant Blue G and bovine serum albumin were obtained from Sigma Chemical Co (St. Louis, MO, USA) and  $K_2HPO_4$  from Reagen. All the other chemicals used in this experiment were of the highest purity.

### 2.2. Patients and samples

The sample consisted of 15 SCD patients and 30 healthy subjects as a control group. The diagnosis of SCD was based on International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems (ICD 10) (D 57.0/57.1) [12]. All patients were receiving current medications, such as Folic Acid and Hydroxyurea. The subjects gave written informed consent to participate in this study and the Human Ethics Committee of the Health Science Center from the Federal University of Santa Maria approved the protocol under number 512.074. In this study, subjects with altered blood pressure, alcoholism, cigarette smoking or diagnostic of diabetes mellitus, autoimmune disease and immunodeficiency were excluded from this study. Sickle cell anemia patients who received blood transfusion at least two months before were also excluded. Four milliliters of blood were obtained from each patient and used for lymphocytes preparation and other biochemical determinations. The same procedure was carried out for the control group.

### 2.3. Hematological determination

A complete blood count was performed in the samples collected in tubes containing 7.2 mg dipotassium EDTA anticoagulant and processed on SYSMEX XT-1800i, Roche Diagnost IC, USA equipment. Fetal hemoglobin was measured by the Betke method according to Naoum (1987) [13].

### 2.4. Isolation of lymphocytes from human blood

Lymphocytes-rich mononuclear cells were isolated from peripheral human blood collected with 7.2 mg dipotassium EDTA as anticoagulant and separated on Ficoll-Histopaque density gradients as described by Böyum [14]. The percentage of lymphocytes was superior to 93% as previously outlined [15]. Right after lymphocytes separation, cell viability was determined by measuring the activity of lactate dehydrogenase (LDH) present in the sample, using the kinetic method of the Labquest apparatus (Diagnostics Gold Analyzer). The procedure was repeated before and after the incubation period and samples with more than 10% of disrupted cells were excluded.

### 2.5. Protein determination

Protein was measured by the Coomassie Blue method according to Bradford (1976) [16] using serum albumin as standard.

### 2.6. E-NTPDase activity determination

The E-NTPDase activity in lymphocytes was determined as previously described by Leal et al. (2005) [17], in which the reaction medium contained 0.5 mM  $CaCl_2$ , 120 mM NaCl, 5 mM KCl, 60 mM glucose and 50 mM Tris-HCl buffer at pH 8.0, with a final volume of 200  $\mu$ L. Twenty microliters of the intact mononuclear cells suspended in saline solution was added to the reaction medium (2–4  $\mu$ g of protein), and pre-incubated for 10 min at 37 °C; incubation proceeded for 70 min. The reaction was initiated by the addition of substrate (ATP or ADP) at a final concentration of 2.0 mM and stopped with 200  $\mu$ L of 10% trichloroacetic acid (TCA). The released inorganic phosphate (Pi) was assayed by a method previously described by Chan et al. (1986) [18] using malachite green as colorimetric reagent and  $KH_2PO_4$  as standard. Controls were carried out by adding the enzyme preparation after TCA addition to correct for non-enzymatic nucleotide hydrolysis. All samples were run in triplicate and the specific activity is reported as nmol of Pi released/min/mg of protein.

### 2.7. E-ADA activity determination

ADA activity in lymphocytes was measured by the method of Giusti and Galanti (1984) [19], which is based on the direct measurement of the formation of ammonia produced, when ADA acts in excess of adenosine. Briefly, 25  $\mu$ L of lymphocytes reacted with 21 mM of the substrate (adenosine), pH 6.5, and incubation was carried out for 1 h at 37 °C. The reaction was stopped by adding 106 mM and 167.8 mM sodium nitroprussiate and hypochlorite solution. Ammonium sulfate of 75  $\mu$ M was used as ammonium standard. All the experiments were performed in triplicate and the values were expressed in U/L for ADA activity. One unit (1U) of ADA is defined as the amount of enzyme required to release 1 mmol of ammonia per minute from adenosine at standard assay conditions.

### 2.8. In vitro effects of drugs used in the treatment of SCD patients on E-NTPDase and E-ADA activities

The *in vitro* effects of Folic acid and Hydroxyurea on E-NTPDase and ADA activities were evaluated. Isolated lymphocytes from health subjects were incubated with Folic acid and Hydroxyurea in the medium reaction as previously described. The concentrations of this drugs used *in vitro* were based on the mean plasma values of the medications [20,21].

## 2.9. Separation of blood serum

The blood samples were collected in tubes without anticoagulant and after the clot formation were centrifuged at 1400 g for 15 min at room temperature. The resultant serum samples were aliquotted in microtubes and kept on ice until the cytokines quantification.

## 2.10. Cytokines measurement

Serum cytokines were simultaneously measured by Cytometric Bead Array. The human Th1/Th2/Th17 kit (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) was applied following manufacturer instructions. Quantitative results were generated using Accuri flow cytometer and FCAP Array software.

## 2.11. Statistical analysis

Variables were expressed as mean  $\pm$  standard errors mean (SEM). The data obtained were analyzed statistically by the Student's *t* test for independent samples and one-way ANOVA followed by Dunnett's Multiple Comparison Test. Differences were considered significant when probability was  $P < 0.05$ .

## 3. Results

### 3.1. General and hematological characteristics of the patients

The samples were constituted of 30 healthy patients with a means male age of 29 (range: 19–37 years old) and mean female age of 23 (range: 18–35 years old), as a control group. The HbSS group (SCA) was composed of five male and ten female patients with a mean male age of 33 (range: 31–38 years old) and mean female age of 26 (range: 18–51 years old). These patients were using for treatment a dose of 5 mg/kg/day and 35 mg/kg/day of Folic Acid and Hydroxyurea, respectively. Hematological determination in SCA patients and control group are expressed in Table 1. The results obtained for HbF ( $P < 0.01$ ,  $n = 15$ ), WBC ( $P < 0.001$ ,  $n = 15$ ), RDW ( $P < 0.001$ ,  $n = 15$ ) and platelets count ( $P < 0.001$ ,  $n = 15$ ) have shown increased in patients with SCA when compared to control group. Already, the results obtained for

**Table 1**  
Hematological determination in patients with sickle cell anemia (SCA) and control group.

Item	Control	SCA	Reference range <sup>a</sup>
WBC ( $\times 10^4/\mu\text{L}$ )	6.89 $\pm$ 0.33	13.55 $\pm$ 0.11 <sup>***</sup>	3.60–11.00
Neutrophils ( $\times 10^4/\mu\text{L}$ )	5.54 $\pm$ 0.13	4.91 $\pm$ 0.34	1.50–7.00
Lymphocytes ( $\times 10^4/\mu\text{L}$ )	3.44 $\pm$ 0.10	3.852 $\pm$ 0.29	1.00–4.50
Monocytes ( $\times 10^4/\mu\text{L}$ )	0.73 $\pm$ 0.05	0.91 $\pm$ 0.10	0.10–1.00
Eosinophils ( $\times 10^4/\mu\text{L}$ )	0.24 $\pm$ 0.03	0.36 $\pm$ 0.08	0–0.50
Basophils ( $\times 10^4/\mu\text{L}$ )	0.04 $\pm$ 0.00	0.05 $\pm$ 0.00	0–0.20
RBC ( $\times 10^6/\mu\text{L}$ )	4.78 $\pm$ 0.10	2.57 $\pm$ 0.12 <sup>***</sup>	4.0–6.1
HbA (g/dL)	14.15 $\pm$ 0.31	8.03 $\pm$ 0.28 <sup>***</sup>	11.6–17.8
HbF (%)	1.81 $\pm$ 0.87	22.53 $\pm$ 4.02 <sup>***</sup>	0.1–2.0
HCT (%)	41.74 $\pm$ 0.72	24.48 $\pm$ 0.93 <sup>***</sup>	35–53
MCV (pg)	87.43 $\pm$ 0.88	95.98 $\pm$ 0.80	80–98
MCHC (g/dL)	33.86 $\pm$ 0.24	33.05 $\pm$ 0.41	31–36
RDW (%)	13.02 $\pm$ 0.11	19.32 $\pm$ 0.72 <sup>***</sup>	12–15
Platelets ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ )	242.6 $\pm$ 11.57	427.6 $\pm$ 41.41 <sup>***</sup>	140–360

Continuous variables are presented as mean  $\pm$  SEM and the other variables are shown as percentage. Groups: control and SCA (sickle cell anemia). (\*\*\*) indicates difference between the groups,  $P < 0.001$  followed by  $P < 0.001$ , with  $n = 15$  (Student's *t* test for independent samples). WBC: white blood cells; RBC: red blood cells; HbA: hemoglobin A; HbF: fetal hemoglobin; HCT: hematocrit; MCV: mean corpuscular volume; MCHC: mean corpuscular hemoglobin concentration; RDW: red cell distribution width.

<sup>a</sup> Taken from Falice (2003).

RBC ( $P < 0.001$ ,  $n = 15$ ), HbA ( $P < 0.001$ ,  $n = 15$ ) and HCT ( $P < 0.001$ ,  $n = 15$ ) are decreased in patients with SCA according to control group.

### 3.2. E-NTPDase activity determination

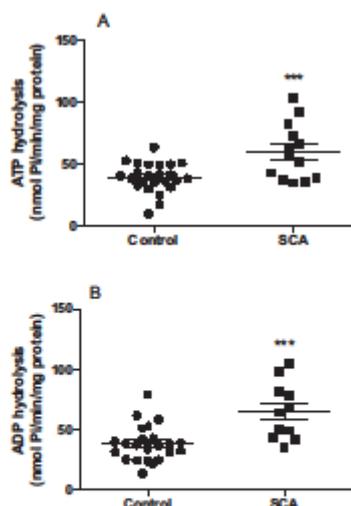
Fig. 1A and B shows the ATP and ADP hydrolysis by E-NTPDase in lymphocytes of patients with SCA and control group. Results of lymphocytes E-NTPDase activity with ATP as substrate are shown in Fig. 1A. The hydrolysis of ATP is altered in patients with SCA (59.8 nmol of Pi/min/mg of protein; SEM = 6.3;  $n = 15$ ;  $P < 0.05$ ), demonstrating that ATP hydrolysis is 52.5% increase when compared to the control group (C) (39.2 nmol of Pi/min/mg of protein; SEM = 2.4;  $n = 30$ ). In addition, results obtained for the lymphocytes E-NTPDase activity with ADP as substrate are shown in Fig. 1B, where the ADP hydrolysis is also increased by 69.2% in the SCA group (64.8 nmol Pi/min/mg; SEM = 7.0;  $n = 15$ ;  $P < 0.05$ ) when compared to C (38.3 nmol of Pi/min/mg of protein; SEM = 2.9;  $n = 30$ ).

### 3.3. E-ADA activity determination

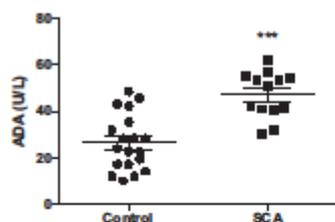
Results obtained for adenosine deamination by E-ADA are shown in Fig. 2. The adenosine deamination is altered in patients with SCA. This activity is 78.8% higher in SCA patients (47.2 U/L; SEM = 2.7;  $n = 15$ ;  $P < 0.05$ ) than control patients (26.4 U/L; SEM = 2.7;  $n = 30$ ).

### 3.4. In vitro effects of drugs used in the treatment of SCD patients on E-NTPDase and E-ADA activities

Results obtained for the *in vitro* effects of E-NTPDase and ADA activities are shown in Table 2. Both enzymes were not altered when folic acid and hydroxyurea drugs were used in the reaction medium ( $P > 0.05$ ,  $n = 15$ ).



**Fig. 1.** ATP (A) and ADP (B) hydrolysis in lymphocytes of SCA and control patients. Enzyme specific activities are reported as nmol of Pi released/min/mg of protein. Variables were expressed as mean  $\pm$  standard error of the mean (SEM),  $\bar{x}$  is represent mean  $\pm$  S.E.M. (\*\*\*) Indicates a significant  $P < 0.001$ , with  $n = 30$  (controls) and  $n = 15$  (SCA) (Student's *t* test for independent sample).



**Fig. 2.** Adenosine desaminase in lymphocytes of control and patients with SCA. Enzyme activity is reported as U/Lg of protein. Variables were expressed as mean  $\pm$  standard error of the mean (SEM). Bars represent mean  $\pm$  SEM. (\*\*\*) Indicates a significant  $P < 0.001$ , with  $n = 30$  (controls) and  $n = 15$  (SCA) (Student's  $t$  test for independent samples).

### 3.5. Serum cytokines levels of SCA and control patients

As shown in Fig. 3, the average serum levels for INF- $\gamma$  and IL-17 pro-inflammatory cytokines showed no statistical difference between control group and SCA patients ( $P > 0.05$ ,  $n = 15$ ). Other pro-inflammatory cytokines, such as IL-6 and TNF- $\alpha$ , showed significant statistical difference from control group to SCA patients. The IL-6 levels decreased 68.4% in SCA patients (5.9 pg/mL; SEM = 0.9;  $n = 15$ ;  $P < 0.05$ ) compared to control (18.7 pg/mL; SEM = 4.6;  $n = 15$ ), while TNF- $\alpha$  diminished 98.8% its levels (1.6 pg/mL; SEM = 0.7;  $n = 15$ ;  $P < 0.01$ ) according to control group (142.8 pg/mL; SEM = 37.1;  $n = 15$ ). The other three cytokines evaluated (IL-2, IL-4 and IL-10) showed no statistical difference ( $P > 0.05$ ,  $n = 15$ ).

## 4. Discussion

Sickle cell anemia is characterized by hemoglobin polymerization that results in sickle-shaped red blood cells, vaso-occlusion, hemolytic anemia, and vasculum-endothelial dysfunction, causing pain, organ injury, and early mortality. Clinical symptoms begin with a physiological decline in fetal hemoglobin concentration (HbF) [2]. Fetal hemoglobin is a known genetic modifier of sickle cell disease. Furthermore, high HbF levels decrease the incidence and severity of vaso-occlusive acute painful episodes, along with is associated with increased survival [22].

In the present study, we evaluated the HbF levels in patients with SCA. The levels are increased in these patients when compared to health subjects. The higher HbF levels within red cells may reduce SCA severity due to its ability to dilute and inhibit HbS polymerization and reduce the mean corpuscular HbS concentration [2,23]. The increased in HbF levels observed in our study, can be attributed to the hydroxyurea (HU) used by these SCA patients. HU is a cytostatic agent, which depletes the intracellular pool of

deoxyribonucleotides required for synthesis and repair of DNA, and this action is due to inhibition of enzyme ribonucleotide reductase. Its hematological effects include increases in HbF percentage, reducing hemolysis, and proven clinical efficacy for preventing acute vaso-occlusive events [24]. The use of HU produces macrocytosis, hindering the recognition of folic acid deficiency, thus it is recommended concomitant prophylactic employment of folic acid in these patients [25].

Among others parameters evaluated in this study, the RDW and platelets count are increased in SCA patients, when compared to control subjects and the reference range. Corroborating with our results, Bowers et al. (2013) [26] and Olaniyi (2014) [27] found platelets concentration; RDW and WBC increased when compared healthy patients and subjects with sickle cell disease. Significantly, elevated platelet and white cell count in SCA patients confirm chronic inflammation as a contributory pathogenic mechanism in SCA.

Recurrent vaso-occlusions, hemolytic events and endothelial cell activation induce a continuous inflammatory response in SCA [28], and biological markers such as leukocytosis have been linked to disease severity [29,30]. The present study shows us an increase on WBC number in SCA patients when compared to health subjects. According to Bandeira et al. (2014) [31], SCA patients have an increased inflammatory profile, and the adherent leukocytes play a direct role in the vascular occlusions caused by sickle cell disease, which manifests as increased levels of inflammatory cytokines, decreased bioavailability of nitric oxide, and oxidative stress [32]. Inflammatory cytokines, such as TNF- $\alpha$ , IL-6, and IL-17, have been shown to be important in the inflammatory process. They are produced by activated endothelial cells and in turn play a significant role in vaso-occlusive crisis in sickle cell disease [33–36].

Previous studies have demonstrated increased levels of circulating TNF- $\alpha$  in SCA individuals in steady-state [37] and during crisis events [38]. With regard receiving hydroxyurea therapy, decreased levels of TNF- $\alpha$  were observed on hydroxyurea-treated patients in our study. Corroborating studies as Lanaro et al. (2009) [39] found that HU therapy decreased plasma TNF- $\alpha$  levels significantly. The same happened with Keikhaei et al. (2013) [40], where decreased levels of TNF- $\alpha$  were observed on hydroxyurea-treated patients compared to those not receiving hydroxyurea.

The HU has several well-defined beneficial effects that could contribute to a reaction in the adhesive properties of erythrocytes, leukocytes and adhesive properties [41], which can also be modulating the cytokines production in this context. Colella et al. (2012) [42] say that the HU therapy can modulate the cytokines markers in patients with SCA, and it is associated with reduced levels of TNF- $\alpha$ . In this study we also find TNF- $\alpha$ , as well as, IL-6 level decreased in SCA patients. Studies have indicated that TNF- $\alpha$  is the main mediator of the acute inflammatory response and that elevated plasma levels of TNF- $\alpha$  stimulate the production of IL-6, which in turn is also responsible for the release of acute phase proteins in inflammation [43,44].

In response to hypoxia and inflammation in SCA pathology, damage-associated molecular pattern molecules (DAMPs) are released from erythrocyte hemolysis and others injured cells all the time [45]. The nucleotide ATP is increasingly released from these cells into the extracellular space, and can modulating the immune response through its capacity to bind and activate multiple nucleotide receptors family members [46,47].

Physiological concentrations of extracellular nucleotides are usually in nanomolar range [48], whilst injury and other pathological conditions, such as inflammation, hypoxia and ischemia, induce the massive release of ATP and ADP from damage and stressed cells into the extracellular space [49]. In high

**Table 2**  
In vitro effects of HU and Folic Acid on E-NTPDase (ATP and ADP hydrolysis) and E-ADA activities in lymphocytes of SCA patients and control group.

	ATP hydrolysis (nmol P <sub>i</sub> /min/ mg protein)	ADP hydrolysis (nmol P <sub>i</sub> /min/ mg protein)	ADA activity (U/L)
Control	56.35 $\pm$ 4.59	48.86 $\pm$ 5.21	22.53 $\pm$ 2.93
Folic acid	60.53 $\pm$ 3.51	46.09 $\pm$ 4.24	20.87 $\pm$ 4.38
Hydroxyurea	51.44 $\pm$ 2.35	51.89 $\pm$ 4.30	21.77 $\pm$ 1.97

Enzyme specific activities are reported as nmol of P<sub>i</sub> released/min/mg of protein and U/L. Groups: C (control), AF (folic acid) and HU (hydroxyurea). Variables were expressed as mean  $\pm$  standard error of the mean (SEM),  $P > 0.05$ , with  $n = 15$  (one-way ANOVA-Dunnnett's Multiple Comparison Test).

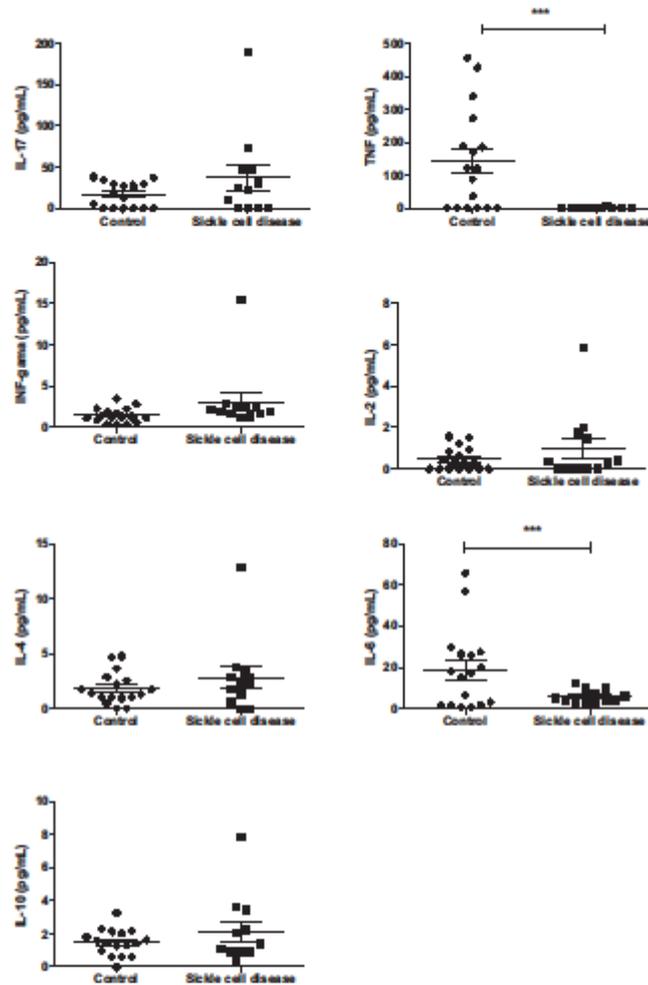


Fig. 3. Serum levels of IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17, INF- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  from patients with SCA and control group. Bars represent mean  $\pm$  S.E.M. (\*\*\*\*) Indicates a significant  $P < 0.001$ ,  $n = 15$  (Student's  $t$  test for independent samples).

concentration, ATP and ADP act as tissue-derived distress signals as DAMPs that initiate immune responses [50]. Extracellular ATP and adenosine levels, as well as the subsequent purinergic signaling, can be physiologically and dynamically controlled by the action of ectonucleotidases expressed in immune cells [51]. E-NTPDase (CD39) is the membrane-bound enzyme involved in the breakdown of ATP and ADP to AMP, which is sequentially hydrolyzed by 5'-nucleotidase to adenosine [52]. E-ADA is another important enzyme that catalyzes the irreversible deamination of adenosine and 2'-deoxyadenosine to inosine and 2'-deoxyinosine respectively, therefore contributing to the removal of adenosine from the extracellular compartment [53]. This enzyme has fundamental biological role in the proliferation and differentiation of lymphoid cells, particularly T lymphocytes, and maturation of monocytes,

performing an important function in the immune system and inflammatory processes.

Based on that, we investigate the activity of E-NTPDase and E-ADA in lymphocytes of treated patients with SCA. The results show an increase on E-NTPDase activity (ATP and ADP) in SCA patients when compared to individuals without hemoglobinopathies. Alterations in this enzyme activity have been also observed in lymphocytes of others hypoxia and inflammation conditions [46,54] but still not in hemoglobinopathies patients. Increased activity of E-NTPDase leads to increased ATP and ADP hydrolysis, leading to the maintenance of their appropriate levels, since high concentrations of ATP in the extracellular medium activate the pro-inflammatory purinergic P2X7 receptors and contributes to tissue damage and inflammation [55].

To be sure that E-NTPDase increased activity is from SCA disease, we also investigate by *in vitro* assay, if Folic Acid and HU could be modulating the E-NTPDase activity. The results showed that both drugs could not modify the E-NTPDase activity in lymphocytes, may then assign that this activity is from E-NTPDase present on SCA lymphocytes cell surface. Silva-Pinto et al. (2014) [56] studied the cell surface expressions of CD39 and CD73 ectoenzymes in SCA patients, but no modulation of CD39 expression by HU in these cells was found. It corroborate with our study when we found that HU did not modulate the E-NTPDase activity.

Multiple lines of evidence have demonstrated that ADO, product as a result of the coordinated function of E-NTPDase, is pivotal in protecting tissue against hypoxic and ischemic insults [57]. In many instances, ATP signaling drives pro-inflammatory responses, and hypoxia-dependent enhancement of ATP conversion to ADO functions as an endogenous feedback loop to dampen excessive inflammatory injury [58]. Knowing about ADO importance in this context, we also investigate the E-ADA activity in lymphocytes of SCA patients, and we find an increased activity when compared to health subjects.

Hypoxia and inflammation are associated with increased production of adenosine from its precursor molecules, thereby shifting the balance from pro-inflammatory ATP signaling towards anti-inflammatory adenosine signaling [59]. Since these enzymes act in a cascade, we can suggest that the 5'-nucleotidase activity could be also increased, resulting in a greater amount of adenosine in the extracellular medium to compensate the pro-inflammatory effects of ATP.

Adenosine levels are significantly elevated in the circulation in SCD patients and mice, and can signal through ADORA2B to contribute to sickling, multitissue damage [45]. As observed in our results, the increase on E-ADA activity contributes to avoid elevated adenosine levels in the extracellular medium and organ injuries, and besides contribute to increase the inosine levels in the extracellular medium. Inosine is another endogenous purine nucleoside, which has multiple anti-inflammatory effects and is able to decrease the production of a host of pro-inflammatory mediators, and suppress TNF- $\alpha$  [60].

As done with E-NTPDase *in vitro* assay, we also evaluated if the treatment used for SCA could be modulating the E-ADA activity in this patients. According to Silva-Pinto et al. (2014) [56], the CD26 (which binds to ADA that converts ADO into inosine) expression is higher in T lymphocytes and NK cells than in B lymphocytes, but there was no modulation of its expression by HU on these cells. This result corroborate with ours when we found that the both drugs could not modify the E-ADA activities in lymphocytes.

The regulation of extracellular nucleotides released in response to hypoxia and inflammation through E-NTPDase and E-ADA enzymes represent an important control of purine-mediated in the SCA disease. Besides, E-ADA enzyme was able to convert adenosine rapidly avoiding elevated adenosine levels in the extracellular medium and organ injuries in these patients. The cytokines profile regarding HU treated patients is modified in attempt to reduce the pro-inflammatory response and prevent vaso-occlusive crisis. In all, further studies will be conducted by our research group to quantify the expression of purinergic enzymes and receptors in order to contribute to a better understanding of purinergic signaling modulation and the illness itself.

#### Disclosure of interest

The authors declare that they have no conflicts of interest concerning this article.

#### Acknowledgments

The authors wish to thank the Projeto Píloão - Presença Negra no Campo, Projeto "Educação e Saúde na Doença Falciforme" do Centro de Ciências da Saúde - Departamento de Saúde da Comunidade - UFMS for supplying some materials used to perform the experiment. This study was supported by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio Grande do Sul (FAPERGS), and Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Brazil.

#### References

- [1] M.H. Steinberg, Sickle cell anemia, the first molecular disease: overview of molecular etiology, pathophysiology, and therapeutic approaches, *Sci. World J.* 8 (2008) 1295–1324.
- [2] D.C. Rees, T.N. Williams, M.T. Gladwin, Sickle-cell disease, *Lancet* 376 (2010) 2018–2031.
- [3] O.S. Platt, Sickle cell anemia as an inflammatory disease, *J. Clin. Invest.* 105 (2000) 337–338.
- [4] K.L. Wallace, J. Linden, Adenosine A2A receptors induced on iNKT and NK cells reduce pulmonary inflammation and injury in mice with sickle cell disease, *Blood* 23 (2010) 5010–5020.
- [5] E.M. Finnegan, A. Turhan, D.E. Golan, G.A. Babin, Adherent leukocytes capture sickle erythrocytes in an *in vitro* flow model of vaso-occlusion, *Am. J. Hematol.* 82 (2007) 266–275.
- [6] A.J. Daulton, J.R. Schlegel, L.R. Lard, A.W. Saleh, R.A. Rojer, Elevated IL-8 levels during sickle cell crisis, *Eur. J. Haematol.* 5 (1998) 302–305.
- [7] B.D. Musa, G.C. Oyenmeluwe, J.O. Hambolu, A.I. Mamman, A.H. Isa, Pattern of serum cytokine expression and T-cell subsets in sickle cell disease patients in vaso-occlusive crisis, *Clin. Vaccine Immunol.* 4 (2010) 602–608.
- [8] E.K. Jackson, Z. Mi, M.T. Koehler, J.A. Carcillo Jr., W.A. Hezler, Injured erythrocytes release adenosine deaminase into the circulation, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 3 (1996) 1250–1260.
- [9] S.P. Colgan, C.T. Taylor, Hypoxia: an alarm signal during intestinal inflammation, *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 7 (2011) 281–287.
- [10] H.K. Bzrachig, J.C. Ibla, G.T. Furuta, M.G. Leonard, K.A. Jacobson, K. Binyoji, S.C. Robson, S.P. Colgan, Coordinated adenosine nucleotide phosphohydrolysis and nucleoside signaling in posthypoxic endothelium: role of ectonucleotidases and adenosine A2B receptors, *J. Exp. Med.* 5 (2003) 783–796.
- [11] R. Franco, A. Valenzuela, C. Luis, J. Blanco, Enzymatic and extracellular role of ecto-adenosine deaminase in lymphocytes, *Immunol. Rev.* 161 (1998) 27–42.
- [12] Brasil, Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas: Doença Falciforme, Portaria SAS/MS n.º 872, de 06 de novembro de 2002.
- [13] P.C. Naoum, Diagnóstico das hemoglobinopatias, ed. Sarvier, São Paulo, 1987.
- [14] A. Böyum, Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Isolation of mononuclear cells by one centrifugation, and of granulocytes by combining centrifugation and sedimentation at 1 g, *Scand. J. Clin. Lab. Invest. Suppl.* 97 (1968) 77–89.
- [15] J.A.S. Jaques, J.F.P. Rezer, J.B. Ruche, J. Gutierrez, A.V. Balmos, U.G. Farias, S.C.A. Luz, C.M. Beirão, M.R.C. Schetinger, V.M. Morsch, D.B.R. Leal, A method for isolation of rat lymphocyte-rich mononuclear cells from lung tissue useful for determination of nucleoside triphosphate diphosphohydrolytic activity, *Anal. Biochem.* 410 (2011) 34–39.
- [16] M.M. Bradford, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.* 72 (1976) 248–254.
- [17] D.B.R. Leal, C.A. Strehler, T.N. Neu, F.P. Bittencourt, C.A.M. Leal, J.F.P. Silva, V.M. Morsch, M.R.C. Schetinger, Characterization of NTPDase (NTPDase1; ecto-5'-nucleotidase; ecto-4-phosphohydrolyase; CD39; EC 3.6.1.5) activity in human lymphocytes, *Biochim. Biophys. Acta* 1721 (2005) 9–15.
- [18] K.M. Chan, D. Delfert, K.D. Junger, A direct colorimetric assay for Ca<sup>2+</sup>-stimulated ATPase activity, *Anal. Biochem.* 157 (1986) 375–380.
- [19] G. Gusti, B. Galanti, Colorimetric Method, in: H.U. Bergmeyer (Ed.), *Methods of enzymatic analysis*, Verlag Chemie, Weinheim, 1984, pp. 315–323.
- [20] C.C. Almeida, H.P. Beirani, O.V. Forteza, B.S. Diniz, *Rev. Páq. Clin.* 3 (2012) 90–93.
- [21] J.L. Santos, Planejamento síntese e avaliação farmacológica de compostos híbridos potencialmente ativos para o tratamento da anemia falciforme, Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacológicas da Faculdade de Ciências Farmacológicas, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Araraquara, SP, 2007.
- [22] C.L.C. Lobo, J.F.C. Pinto, E.M. Nascimento, G.P. Moura, G.P. Cardoso, J.S. Hawkins, The effect of hydroxycarbamide therapy on survival of children with sickle cell disease, *Br. J. Haematol.* 6 (2013) 852–860.
- [23] M.H. Steinberg, P. Sebastiani, Genetic modifiers of sickle cell disease, *Am. J. Hematol.* 8 (2012) 795–803.
- [24] J. Howard, P. Telfer, Treatment of sickle cell disease. Sickle cell disease in clinical practice, 2015.

**3 MANUSCRITO ACEITO**

**Alteração na atividade das enzimas E-NTPDase/E-ADA e na expressão da CD39 em plaquetas de pacientes com anemia falciforme**

**Altered E-NTPDase/E-ADA Activities and CD39 Expression in Platelets of Sickle Cell Anemia Patients**

Lívia G. Castilhos; Pedro H. Doleski; Stephen A. Adefegha; Lara V. Becker; Jader B. Ruchel; Daniela B.R. Leal.

**Aceito pela revista “Biomedicine & Pharmacotherapy”**

## **Altered E-NTPDase/E-ADA Activities and CD39 Expression in Platelets of Sickle Cell Anemia Patients**

Lívia G. Castilhos<sup>a,b</sup>; Pedro H. Doleski<sup>c</sup>; Stephen A. Adefegha<sup>a,d</sup>; Lara V. Becker<sup>c</sup>; Jader B. Ruchel<sup>c</sup>; Daniela B.R. Leal<sup>a,b,c</sup>

<sup>a</sup>Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria, Av. Roraima, 97105-900, Santa Maria-RS, Brazil

<sup>b</sup>Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria, Av. Roraima, 97105-900, Santa Maria-RS, Brazil

<sup>c</sup>Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Toxicológica, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Universidade Federal de Santa Maria, Av. Roraima, 97105-900, Santa Maria-RS, Brazil)

<sup>d</sup>Department of Biochemistry, Federal University of Technology, P. M. B. 704, Akure, Nigeria

### **Corresponding authors at:**

Departamento de Microbiologia e Parasitologia/CCS/UFSM - Universidade Federal de Santa Maria (UFSM). Av. Roraima, 97105-900, Santa Maria-RS, Brazil.

## Abstract

Sickle cell anemia (SCA) is a hemoglobinopathy characterized by hemolysis and vaso-occlusions caused by rigidly distorted red blood cells. Sickle cell crisis is associated with extracellular release of nucleotides and platelets, which are critical mediators of hemostasis participating actively in purinergic thromboregulatory enzymes system. This study aimed to investigate the activities of purinergic system ecto-enzymes present on the platelet surface as well as CD39 and CD73 expressions on platelets of SCA treated patients. Fifteen SCA treated patients and 30 health subjects (control group) were selected. Ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase (E-NTPDase), ecto-5'-nucleotidase (E-5'NT) and ecto-adenosine deaminase (E-ADA) activities were measured in platelets isolated from these individuals. Results demonstrated an increase of 41 % in the E-NTPDase for ATP hydrolysis, 52% for ADP hydrolysis and 60 % in the E-ADA activity in SCA patients ( $P < 0.05$ ); however, a two folds decrease in the CD39 expression in platelets was observed in the same group ( $P < 0.01$ ). The increased E-NTPDase activity could be a compensatory mechanism associated with the low expression of CD39 in platelets. Besides, alteration of these enzymes activities suggests that the purinergic system could be involved in the thromboregulatory process in SCA patients.

**Keywords:** Sickle cell anemia; Platelet; CD39; CD73; Adenosine deaminase

## 1. Introduction

Sickle cell anemia (SCA) is a consequence of a point mutation in the gene encoding  $\beta$ -globin resulting in a single amino acid substitution of  $\beta$ -6 glutamic acid to valine, leading to sickle shaped hemoglobin (HbS). This hemoglobin polymerizes after deoxygenating to form polymer crystals within the erythrocyte in individuals with two copies of the mutated allele [1]. Vaso-occlusive crisis is the main clinical manifestation and caused by a mechanical obstruction of small blood vessels by rigidly distorted (sickled) red blood cells [2]. Ischemia and reperfusion injury with resultant activation of inflammatory cells have been implicated as important contributors to the pathophysiology and disease mechanism of vascular occlusion during SCA [3].

Sickle cell crisis is associated with the extracellular release of nucleotides, particularly adenosine triphosphate (ATP) and adenosine diphosphate (ADP) [4]. Platelets are well known for their function as critical mediators of hemostasis including platelet adhesion, aggregation, and subsequent formation of a platelet thrombus [5]. Circulating platelets in these patients are chronically activated and platelet aggregation may be increased [6;7]. This could be attributed to the increased number of young, metabolically active platelets or increased plasma levels of platelets agonists including the adenosine diphosphate or thrombin in the blood of sickle cell patients [8;9].

Nucleotides released into the extracellular compartment, ATP (and ADP) functions as agonist on purinergic P2 receptors. After activation of ATP receptors, P2 signaling is terminated by diffusion of ligand away from its receptors, and hydrolyzed to adenosine. This process occurs in two separate steps under control of specific ectonucleotidases [10]. During hypoxia, adenosine (ADO) production is increased and mediated by two sequential enzymes; E-NTPDase and E-5'-nucleotidase. These enzymes have similar orientation toward the extracellular compartment. E-NTPDase (CD39); a member of the ectonucleoside triphosphate

diphosphohydrolase family, converts ATP and ADP into adenosine monophosphate (AMP), whereas E-5'-nucleotidase (CD73); converts AMP into ADO [11;12]. Following these steps, ADO levels are controlled by ADO kinase which rephosphorylates ADO, and E-ADA, which converts ADO into inosine [13].

The nucleotide ADP is the main promoter of platelet aggregation [14], whereas adenosine is a potent inhibitor of this aggregation and an important modulator of vascular tone [15]. Moreover, studies have demonstrated that ATP has a complex role in the regulation of platelet aggregation. High ATP concentrations inhibit aggregation induced by ADP, but low concentrations can contribute to enhanced collagen, thromboxane A<sub>2</sub>, and thrombin-induced aggregation [16].

The importance of purinergic signaling ectoenzymes and platelets in homeostatic regulation of several cases of ischemia and reperfusion have been reported [17;18]. However, there is limited information on the effects of these enzymes in SCA patients. Based on this novelty, it is extremely relevant to evaluate the ectonucleotidases activities such as CD39, CD73 and E-ADA, as well as their expressions in platelets of SCA patients, since these enzymes are platelet membrane-bound and are able to control the extracellular nucleotide levels.

## **2. Material and methods**

### **2.1 Chemicals**

The substrates ATP, ADP, AMP, adenosine, as well as trizma base, coomassie brilliant blue G and bovine serum albumin were obtained from Sigma Chemical Co (St. Louis, MO, USA) and K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, from Reagen. All the other chemicals used in this experiment were of the highest purity.

## **2.2 Patients and samples**

The sample consisted of 15 SCA patients and 30 healthy subjects as a control group. The diagnosis of SCA was based on International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems (ICD 10) (D 57.0/57.1) [19]. All patients were currently receiving medications, such as folic acid and hydroxyurea. The subjects gave written informed consent to participate in this study and the Human Ethics Committee of the Health Science Center from the Federal University of Santa Maria approved under the registration number; 512.074. Subjects with altered blood pressure, alcoholism, cigarette smoking or diagnostic of diabetes mellitus, autoimmune disease and immunodeficiency were excluded in this study. SCA patients who received blood transfusion at least two months earlier were also excluded. Four milliliters of blood were obtained from each patient, used for platelets preparation. The same procedure was also carried out for the control group.

## **2.3 Platelet preparation**

PRP was prepared by the method of Pilla et al. [20] with slight modification by Lunkes et al. [21]. Briefly, peripheral blood was collected in 129 mM sodium citrate as anticoagulant and centrifuged at 160 g for 15 min. Afterwards, the PRP was centrifuged at 1400 g for 30 min and washed twice with 3.5 mM HEPES buffer, pH=7.0, containing 142mM NaCl, 2.5mM KCl and 5.5mM glucose. The washed platelets were suspended in 3.5 mM HEPES buffer, pH=7.0.

## **2.4 Protein determination**

Protein was measured by the Comassie Blue method according to Bradford [22] using serum albumin as standard.

## **2.5 E-NTPDase and E-5'-NT activities**

The E-NTPDase enzymatic assay in platelets was carried out in a reaction medium containing 5 mM CaCl<sub>2</sub>, 100 mM NaCl, 4 mM KCl, 5 mM glucose and 50 mM Tris-HCl buffer, pH=7.4, at a final volume of 200 µL as described by Lunkes et al. [21]. For AMP hydrolysis, the E-5'-NT activity was carried out as previously described, except that the 5 mM CaCl<sub>2</sub> was replaced by 10 mM MgCl<sub>2</sub>. Twenty microliters of the isolated platelets (8-12 µg of protein) was added to the reaction mixture and pre-incubation proceeded for 10 min at 37°C. The reaction was initiated by the addition of ATP or ADP at a final concentration of 1 mM, and AMP at a final concentration of 2 mM, and the time of incubation for 60 min. Both enzyme assays stopped by addition of 200 µL of 10% TCA to provide a final concentration of 5%. Subsequently, the tubes were chilled on ice for 10 min. The inorganic phosphate (Pi) released was measured by the method of Chan et al. [23] using malachite green as the colorimetric reagent and KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> as standard. Controls were carried out to correct the non-enzymatic hydrolyses of nucleotides by adding enzyme preparation after 10% TCA addition. All samples were tested in triplicate. Enzyme-specific activities were reported as nmol of Pi released/min/mg of protein.

## **2.6 E-ADA activity**

E-ADA activity from platelets was determined according to Giusti and Galanti [24] based on direct measurement of the ammonia formation, produced when adenosine deaminase acts in excess of adenosine. Briefly, 50 µL of platelets reacted with 21mM of adenosine were incubated at 37 °C for 60 min, pH 6.5. Afterwards, the reaction was stopped by adding a solution of 106.2 mM phenol and 167.8 µM sodium nitroprussiate and a 0.082% hypochlorite solution. The amount of ammonia produced was measured at 620 nm and results reported as U/L. One unit (1U) of ADA is defined as the amount of enzyme required to release 1mmol of ammonia per minute from adenosine at standard assay conditions.

## **2.7 *In vitro* effects of drugs used in the treatment of SCA patients on E-NTPDase, E-5'-NT and E-ADA activities**

The *in vitro* effects of folic acid and hydroxyurea on E-NTPDase, E-5'-Nucleotidase and ADA activities were evaluated. Isolated platelets from health subjects were incubated with folic acid and hydroxyurea in the medium reaction as previously described. The concentrations of these drugs used *in vitro* were based on the mean plasma values of the medications [25].

## **2.8 Flow cytometry analysis**

To analyze the CD39 and CD73 expression on platelets of SCA patients, the blood was collected in tubes containing 7.2 mg dipotassium EDTA anticoagulant. Anti-human monoclonal Ab specific for CD61, CD39 and CD73 were conjugated to fluorescein isothiocyanate (FITC), Peridinin Chlorophyll (PerCP) and phycoerythrin (PE) from BD Biosciences (San Jose, CA). Platelets were analyzed by flow cytometry using an Accuri C6 flow cytometer (BD Biosciences).

## **2.9 Statistical analysis**

Variables were expressed as mean±standard errors mean (SEM). The data obtained were analyzed statistically by the Student's *t* test for independent samples and one-way ANOVA followed by Dunnett's multiple comparison test. Differences were considered significant when probability was  $P < 0.05$ .

## **3. Results**

### **3.1 General characteristics of the patients**

The samples comprise of 30 healthy patients with an average male age of 29 (range: 19–37 years old) and average female age of 23 (range: 18–35 years old), as a control group. The HbSS

group (SCA) was composed of five male and ten female patients with a mean male age of 33 (range: 31–38 years old) and mean female age of 26 (range: 18–51 years old). These patients were administered 5 mg/kg/day and 35 mg/kg/day doses of folic acid and hydroxyurea respectively.

### **3.2 E-NTPDase and E-5'-nucleotidase activities**

Fig. 1A and B shows the ATP and ADP hydrolyses by E-NTPDase in platelets of patients with SCA and control groups. Results for platelets E-NTPDase activity with ATP as substrate are shown in Fig. 1A. The hydrolysis of ATP is altered in patients with SCA (11.0 nmol of Pi/min/mg of protein; SEM=0.9; n=15;  $P < 0.05$ ), demonstrating that ATP hydrolysis is 41.1% higher in this group when compared to control (7.8 nmol of Pi/min/mg of protein; SEM=0.8; n=30). In addition, results obtained for platelets E-NTPDase activity with ADP as substrate are shown in Fig. 1B, where the ADP hydrolysis is also increased (52.6%) in the SCA group (7.5 nmol Pi/min/mg; SEM=0.6; n=15;  $P < 0.01$ ) when compared to control (4.9 nmol of Pi/min/mg of protein; SEM=0.4; n=30). The figure 1C shows the AMP hydrolysis by E-5'NT in platelets of patients with SCA and control group. The hydrolysis of AMP is not altered in patients with SCA (3.5 nmol of Pi/min/mg of protein; SEM=0.3; n=15;  $P > 0.05$ ), demonstrating that during SCA the E-5'NT activity is not modified, comparing to control group (3.9 nmol of Pi/min/mg of protein; SEM=0.4; n=30).

### **3.3 E-ADA activity**

Results obtained for adenosine deamination by E-ADA are shown in Fig. 2. The adenosine deaminase activity was altered in patients with SCA. This activity was 60.1% higher in SCA patients (14.0 U/L; SEM=2.1; n=15;  $P < 0.05$ ) than control patients (8.7 U/L; SEM=1.3; n=30).

### **3.4 *In vitro* effects of drugs used in the treatment of SCD patients on E-NTPDase, E-5'NT and E-ADA activities**

Results obtained for the *in vitro* effects of E-NTPDase, E-5'NT and E-ADA activities are shown in Table 1. The results revealed that none of the enzymes were altered when folic acid and hydroxyurea drugs were used in the reaction medium ( $P > 0.05$ ,  $n=15$ ).

### **3.5 Flow cytometry analysis**

Flow cytometry revealed significant decreased (twofolds) CD39<sup>+</sup> expression on platelets surface of SCA patients compared with the control group ( $n=15$ ,  $P<0.01$ ; Figure 3A). The flow cytometric analysis showed no significant difference for CD73 platelets expression between SCA and control patients ( $n=15$ ,  $P>0.05$ ; Figure 3B).

## **4. Discussion**

The blood cells of patients with SCA have tendencies to adhere to vascular endothelium, start a cell--vessel wall adhesive interactions and vaso-occlusive crisis [26]. These findings have led to the current postulation that an enhanced tendency of red blood cells (sickled and non-sickled) to adhere to vascular endothelium and activate platelets and leukocytes as primary causative factors of vaso-occlusion [27;28]. Circulating platelets in SCA patients are chronically activated and this contributes to increased thromboembolic events, drives inflammation and vascular injury [29].

Given the potential involvement of platelets in the pathophysiology of vaso-occlusion in SCA and the crucial role that ectonucleotidases play in several physiological events, through controlling nucleotides in the extracellular environment, we investigated the E-NTPDase and E-5' nucleotidase activities in platelets of patients with SCA that are currently on drug treatment

(folic acid and hydroxyurea). The observed increase in E-NTPDase activities (both in the conversion of ATP to ADP and ADP to AMP) in SCA patients when compared to the healthy subjects, could be attributed to erythrocyte destruction initiated by oxidative cellular injury and activated thrombin action [30]. This agrees with previous results obtained from our research group where increased E-NTPDase activity was also observed in lymphocytes of SCA patients [25] and in vaso-occlusive condition [31]. In addition, alterations in these enzymes activities have been observed in platelets of hypoxia and inflammation conditions [32;33].

Furthermore, a low CD39 expression in platelets of SCA patients when compared to healthy subjects could be as a result of chemotherapy (hydroxyurea and folic acid) administered during the experiments. These drugs may have modulated the E-NTPDase activity thereby causing reduced expression of CD39. This is in agreement with the work of Silva-Pinto and colleagues (2014) [34] where intriguing evidence for a reduction in the expression of CD39 on T-lymphocytes and CD73 in natural killer cells of hydroxyurea (HU)-treated patients. Furthermore, both CD39 and CD73 were also reported to be hypoxia-responsive and thus reduction in their expression may directly or indirectly affect anemia [27]. Koziak et al. (1999) [35] reported that the attenuation of E-NTPDase/CD39 expression in platelets and endothelial cells of healthy individuals. However, the modulation of E-NTPDase/CD39 expression was associated with platelet activation, thrombus formation and may be possible chemotherapeutic targets [36].

Reduced degradation of ADP by ectonucleotidases contributes to the amplification of ADP evoked aggregation [37]. To be sure that this E-NTPDase increased activity is from SCA disease and not a result from therapy used by these patients, we also investigate by *in vitro* assay if folic acid and HU could affect the activity of E-NTPDase. The results showed that both drugs could not modify the E-NTPDase activity in platelets. This may be adjudged that this activity is solely from the enzyme present on the cell surface of SCA platelet.

The generated AMP by E-NTPDase/CD39 is further metabolized through the E-5'nucleotidase/CD73 following the purinergic enzyme cascade [38]. In this study, it was observed that there was no significant difference in E-5'NT activity between the SCA patients and healthy subjects. This suggests that the AMP produced by E-NTPDase activities may have been reconverted to ADP by adenylate kinase-1 (AK1) which plays a pivotal role in the metabolism of circulating ADP [39]. The activity of AK1 activity has been proposed to be distributed in the human plasma, platelets and red blood cells [40]. AK1 can be considered a crucial enzyme of nucleotide homeostasis and as cellular energy regulator site in cases of hypoxia and metabolic stress through ADP anabolism [39;41]. This study therefore suggests that the ADP generated by AK1 could contribute to increased platelet aggregation in SCA patients; since their platelets are known to circulate in activated state and result into altered platelet aggregation [42]. In addition, Proença-Ferreira et al. [42] also reported that treatment with HU in SCA patients did not alter the adhesion ability of platelets when compared to SCA patients who used HU treatment.

Adenosine is a purine nucleoside generated by the breakdown of adenosine monophosphate (AMP) from the degradation by the consecutive action of ectonucleotidases [43]. High adenosine levels have been identified in the plasma of patients with SCA [44]. Adenosine is known as one of the most important endogenous molecules able to prevent tissue damage in cases of ischemia and reperfusion. Therefore, the excess in extracellular levels of adenosine is identified by several authors as the main cause of priapism development (prolonged and painful erection process of the penis without sexual stimulation) in SCA patients, thus revealing the negative role of adenosine in disease sickle [43;45]. In view of these roles, this study investigated and compared the E-ADA activity in platelets of SCA patients and health subjects. The results revealed a significant increase in E-ADA activity in SCA patients when compared to healthy subjects. This corroborates with the previous work in our laboratory

where an increased E-ADA activity was reported in lymphocytes of SCA patients [25]. Furthermore, the results also reveal that increased E-ADA activity in platelets of SCA patients may lead to an increase in extracellular inosine production. Inosine is a purine nucleoside formed during the deamination of adenosine by E-ADA. Inosine have anti-platelet activity by inhibiting platelet function and thus prevent thrombus formation and ischemic process [46;47]. In addition, an *in vitro* study was performed to verify if SCA patient's therapy could modify the enzyme activity. The results show that there was no alteration in the enzyme activities by Folic Acid and HU; however, this may be attributed to the activity of E-ADA cell surface.

In conclusion, the results revealed that the activities of E-NTPDase and E-ADA are increased in platelets of SCA patients. This could be attributed to the thromboregulatory processes and vaso-occlusive crisis associated with SCA. However, low expression of CD39 observed in SCA patients could be a compensatory mechanism that could help in activating high energy phosphate for several physiological processes in SCA patients. Further studies are ongoing in our laboratory to quantify the purinergic nucleotides and nucleosides in serum of SCA patients in order to shed more light on purinergic signaling modulation in SCA disease.

### **Conflict of interests**

The authors declare that they have no conflict of interest.

### **Acknowledgments**

The authors sincerely thank the SCA patients, the Serviço de Hemato-Oncologia do Hospital Universitário de Santa Maria and Projeto Pilão - Presença Negra no Campo, Projeto "Educação e Saúde na Doença Falciforme" do Centro de Ciências da Saúde – Departamento de Saúde da Comunidade – UFSM for supplying some materials used for the experiment. This study was

supported by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq),  
Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio Grande do Sul (FAPERGS), and Fundação  
Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Brazil.

## References

- [1] D.C. Rees, T.N. Williams, M.T. Gladwin, Sickle-cell disease, *Lancet* 376 (2010) 2018–2031.
- [2] R.I. Raphael, Pathophysiology and treatment of sickle cell disease, *Clin. Adv. Hematol. Oncol.* 3 (2005) 492–505.
- [3] K.L. Wallace, J. Linden, Adenosine A<sub>2A</sub> receptors induced on iNKT and NK cells reduce pulmonary inflammation and injury in mice with sickle cell disease, *Blood* 116 (2010) 5010–5020.
- [4] E.K. Jackson, Z. Mi, M.T. Koehler, J.A. Carcillo Jr., W.A. Herzer, Injured erythrocytes release adenosine deaminase into the circulation, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 279 (1996) 1250–1260.
- [5] H.K. Eltzschig, T. Eckle, Ischemia and reperfusion from mechanism to translation, *Nat. Med.* 17 (2011) 1391–1401.
- [6] M.W. Kenny, A.J. George, J. Stuart, Platelet hyperactivity in sickle-cell disease: a consequence of hyposplenism, *J. Clin. Pathol.* 33 (1980) 622–625.
- [7] J. Westwick, E.J. Watson-Williams, S. Krishnamurthi, G. Marks, V. Ellis, M.F. Scully, J.M. White, V.V. Kakkar, Platelet activation during steady state sickle cell disease, *J. Med.* 14 (1983) 17–36.
- [8] V.T. Garrido, R. Proenca-Ferreira, V.M. Dominical, F. Traina, M.A. Bezerra, M.R. de Mello, M.P. Colella, A.S. Araujo, S.T. Saad, F.F. Costa, N. Conran, Elevated plasma levels and platelet-associated expression of the pro-thrombotic and pro-inflammatory protein, TNFSF14 (LIGHT), in sickle cell disease, *Br. J. Haematol.* 158 (2012) 788–797.
- [9] S.P. Lee, K.I. Ataga, E.P. Orringer, D.R. Phillips, L.V. Parise, Biologically active CD40 ligand is elevated in sickle cell anemia: potential role for platelet-mediated inflammation, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 26 (2006) 1626–1631.

- [10] D. Kohler, T. Eckle, M. Faigle, A. Grenz, M. Mittelbronn, S. Laucher, M.L. Hart, S.C. Robson, C.E. Müller, H.K. Eltzschig, CD39/ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 1 provides myocardial protection during cardiac ischemia/reperfusion injury, *Circulation*, 116 (2007) 1784-1794.
- [11] H.K. Eltzschig, J.C. Ibla, G.T. Furuta, M.O. Leonard, K.A. Jacobson, K. Enyoloji, S.C. Robson, S.P. Colgan, Coordinated adenine nucleotide phosphohydrolysis and nucleoside signaling in posthypoxic endothelium: role of ectonucleotidases and adenosine A2B receptors, *J. Exp. Med.* 198 (2003) 783–796.
- [12] R. Resta, Y. Yamashita, L.F. Thompson, Ecto-enzyme and signaling functions of lymphocyte CD73, *Immunol. Rev.* 161(1998) 95–109.
- [13] R. Franco, A. Valenzuela, C. Luis, J. Blanco, Enzymatic and extraenzymatic role of ecto-adenosine deaminase in lymphocytes, *Immunol. Rev.* 161 (1998) 27– 42.
- [14] O.O. Braun, S. Amisten, A. Wihlborg, K. Hunting, D. Nilsson, D. Erlinge, Residual platelet ADP reactivity after clopidogrel treatment is dependent on activation of both the unblocked P2Y1 and the P2Y12 receptor and is correlated with protein expression of P2Y12, *Purinergic Signal.* 3 (2007)195–201.
- [15] M. Rozalski, M. Nocun, C. Watala, Adenosine diphosphate receptors on blood platelets potential new targets for antiplatelet therapy, *Acta Biochim. Pol.* 52 (2005) 411–415.
- [16] A.V. Birk, J. Broekman, E.M. Gladek, H.D. Robertson, J.H.F. Drosopoulos, A.J. Marcus, H. Szeto, Role of extracellular ATP metabolism in regulation of platelet reactivity, *J. Lab. Clin. Med.* 140 (2002) 166–175.
- [17] G. Burnstock, V. Ralevic. Purinergic signaling and blood vessels in health and disease, *Pharmacol. Rev.* 66 (2014) 102–192.

- [18] A.J. Marcus, M.J. Broekman, J.H. Drosopoulos, N. Islam, D.J. Pinsky, C. Sesti, R. Levi, Heterologous cell–cell interactions: thromboregulation, cerebroprotection and cardioprotection by CD39 (NTPDase-1), *J. Thromb. Haemost.* 1 (2003) 2497–2509.
- [19] World Health Organization. [2015.10.02]. Website <http://www.who.int/classifications/icd/en/>.
- [20] C. Pilla, T. Emanuelli, S.S. Frassetto, A.M.O. Battastini, R.D. Dias, J.J.F. Sarkis, ATP diphosphohydrolase activity (Apyrase, EC 3.6.1.5.) in human blood platelets, *Platelets* 7 (1996) 225-230.
- [21] G. Lunkes, D. Lunkes, F. Stefanello, A. Morsch, V. Morsch, C. Mazzanti, M. Schetinger, Enzymes that hydrolyze adenine nucleotides in diabetes and associated pathologies, *Thromb. Res.* 109 (2003) 189-194.
- [22] M.M. Bradford, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.* 72 (1976) 248–254.
- [23] K.M. Chan, D. Delfert, K.D. Junger, A direct colorimetric assay for Ca<sup>2+</sup> stimulated ATPase activity, *Anal. Biochem.* 157 (1986) 375–380.
- [24] G. Giusti, B. Galanti, Colorimetric method, in: H.U. Bergmeyer (Ed.), *Methods of Enzymatic Analysis*, VerlagChemie, Weinheim, 1984, pp. 315–323.
- [25] L.G. Castilhos, P.H. Doleski, T.M.D. Bertoldo, D.F. Passos, C.M. Bertoncheli, J.F.P. Rezer, J.B. Schlemmer, D.B.R. Leal, Sick cell anemia induces changes in peripheral lymphocytes E-NTPDase/E-ADA activities and cytokines secretion in patients under treatment, *Biomed. Pharmacother.* 73 (2015) 102–108.
- [26] D.K. Kaul, E. Finnegan, G.A. Barabino, Sick cell-endothelium interactions, *Microcirculation* 16 (2009) 97–111.
- [27] D.K. Kaul, M.E. Fabry, R.L. Nagel, The pathophysiology of vascular obstruction in the sickle syndromes, *Blood Rev.* 10 (1996) 29–44.

- [28] I. Okpala, Leukocyte adhesion and the pathophysiology of sickle cell disease, *Curr Opin. Hematol.* 13 (2006) 40–44.
- [29] E. Sparkenbaugh, R. Pawlinski, Interplay between coagulation and vascular inflammation in sickle cell disease, *Br. J. Haematol.* 162 (2013) 3-14.
- [30] S. Voskou, M. Aslan, P. Fani, M. Phylactides, M. Kleanthous, Oxidative stress in  $\beta$ -thalassemia and sickle cell disease, *Redox Biol.* 6 (2015) 226-239.
- [31] S.H. Visovatti, M.C. Hyman, D. Bouis, R. Neubig, V.V. McLaughlin, D.J. Pinsky, Increased microparticle CD39 in IPAH, *PLoS One* 7 (2012) e40829.
- [32] D. Köhler, T. Eckle, B.S.M. Faigle, A.M.D. Grenz, M.M.D. Mittelbronn, S.B.S. Laucher, M.L. Hart, S.C. Robson, C.E. Müller, H.K. Eltzschig, CD39/ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 1 provides myocardial protection during cardiac ischemia/reperfusion injury, *Circulation* 116 (2007) 1784-1794.
- [33] S.C. Robson, J. Sévigny, M. Imai, O. Guckelberger, K. Enjyoji, Thromboregulatory potential of endothelial CD39/nucleoside triphosphate diphosphohydrolase: modulation of purinergic signaling in platelets, *Emerg. Therap. Targets* 4 (2000) 55-171.
- [34] A.C. Silva-Pinto, C. Dias-Carlos, F. Saldanha-Araujo, F.I. Ferreira, P.V. Palma, A.G. Araujo, R.H. Queiroz, J. Elion, D.T. Covas, M.A. Zago, R.A. Panepucci, Hydroxycarbamide modulates components involved in the regulation of adenosine levels in blood cells from sickle-cell anemia patients, *Ann. Hematol.* 93 (2014) 1457-65.
- [35] K. Koziak, J. Sévigny, S.C. Robson, J.B. Siegel, E. Kaczmarek, Analysis of CD39/ATP diphosphohydrolase (ATPDase) expression in endothelial cells, platelets and leukocytes, *Thromb. Haemost.* 82 (1999) 1538–1544.
- [36] B. Atkinson, K. Dwyer, K. Enjyoji, S.C. Robson, Ectonucleotidases of the CD39/NTPDase family modulate platelet activation and thrombus formation: potential as therapeutic targets, *Blood Cells Mol. Dis.* 36 (2006) 217–222.

- [37] S. Jones, R.J. Evans, M.P. Mahaut-Smith, Extracellular Ca<sup>2+</sup> modulates ADP-evoked aggregation through altered agonist degradation: implications for conditions used to study P2Y receptor activation, *Br. J. Haematol.* 153 (2011) 83–91.
- [38] H. Zimmermann, M. Zebisch, N. Sträter, Cellular function and molecular structure of ectonucleotidases, *Purinergic signal.* 8 (2012) 437-502.
- [39] G. Yegutkin, B. Wieringa, S.C. Robson, S. Jalkanen, Metabolism of circulating ADP in the bloodstream is mediated via integrated actions of soluble adenylylase-1 and NTPDase1/CD39 activities, *FASEB J.* 26 (2012) 3875-3883.
- [40] R.J. Haslam, D.C. Mills, The adenylylase of human plasma, erythrocytes and platelets in relation to the degradation of adenosine diphosphate in plasma, *Biochem. J.* 103 (1967) 773–784.
- [41] P. Dzeja, Integration of adenylylase, glycolytic circuits in cellular energetics. *Molec. Syst. Bioenerg.* 8 (2007) 265–302.
- [42] R. Proença-Ferreira, A.F. Brugnerotto, V.T. Garrido, V.M. Dominical, D.M. Vital, M.F. Ribeiro, M.E. dos Santos, F. Traina, S.T. Olalla-Saad, F.F. Costa, N. Conran, Endothelial activation by platelets from sickle cell anemia patients, *Plos one* 2 (2014) e89012.
- [43] K. Sun, Y. Xia, New insights into sickle cell disease: a disease of hypoxia, *Curr. Opin. Hematol.* 20 (2013) 215–221.
- [44] Y. Zhang, Y. Dai, J. Wen, W. Zhang, A. Grenz, H. Sun, L. Tao, G. Lu, D.C. Alexander, M.V. Milburn, L. Carter-Dawson, D.E. Lewis, W. Zhang, H.K. Eltzschig, R.E. Kellems, M.R. Blackburn, H.S. Juneja, Y. Xia, Detrimental effects of adenosine signaling in sickle cell disease, *Nat. Med.* 17 (2011) 79–86.
- [45] T. Mi, S. Abbasi, H. Zhang, K. Uray, J.L. Chunn, L.W. Xia, J.G. Molina, N.W. Weisbrodt, R.E. Kellems, M.R. Blackburn, Y. Xia, Excess adenosine in murine penile erectile

tissues contributes to priapism via A2B adenosine receptor signaling, *J. Clin. Invest.* 118 (2008) 1491–1501.

[46] E. Fuentes, J. Pereira, D. Mezzano, M. Alarcón, J. Caballero, I. Palomo, Inhibition of platelet activation and thrombus formation by adenosine and inosine: studies on their relative contribution and molecular modeling, *PLoS One* 9 (2014) e112741.

[47] G. Hsiao, K.H. Lin, Y. Chang, T.L. Chen, N.H. Tzu, D.S. Chou, J.R. Sheu, Protective mechanisms of inosine in platelet activation and cerebral ischemic damage, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 25 (2005) 1998–2004.

## Figures legend

**Figure 1.** ATP (A), ADP (B) and AMP (C) hydrolysis in platelets of SCA and control patients. Enzyme specific activities were reported as nmol of Pi released/min/mg of protein. Variables were expressed as mean  $\pm$  standard error of the mean (SEM). Bars represent mean  $\pm$  S.E.M. (“\*”) indicates a significant ( $P<0.05$ ) difference between the SCA patients (n=15) and control (n=30). (“\*\*”) indicates a significant ( $P<0.01$ ) difference between the SCA patients (n=15) and control (n=30). Student's *t* test for independent samples was used for all the analyses.

**Figure 2.** Adenosine deamination in platelets of control and patients with SCA. Enzyme activities were reported as U/L. Variables were expressed as mean  $\pm$  standard error of the mean (SEM). Bars represent mean  $\pm$  S.E.M. (“\*”) indicates a significant  $P<0.05$ , with n=30 (controls) and n=15 (SCA) (Student's *t* test for independent samples.).

**Figure 3.** CD39 (A) and CD73 (B) expression on platelets were analyzed using flow cytometry in control and sickle cell disease groups. Data were gated on CD61/CD39 or CD61/CD73 plots. Bars graph summarizing mean  $\pm$  S.E.M. (“\*\*”) indicates a significant  $P<0.01$ , with n=15 (controls) and n=15 (SCA) (Student's *t* test for independent samples.).

**Table 1**

*In vitro* effects of HU and Folic Acid on E-NTPDase (ATP, ADP hydrolysis), E-5'NT (AMP hydrolysis) and E-ADA activities in platelets of healthy subjects.

	<b>ATP hydrolysis</b> (nmol Pi/min/mg protein)	<b>ADP hydrolysis</b> (nmol Pi/min/mg protein)	<b>AMP hydrolysis</b> (nmol Pi/min/mg protein)	<b>E-ADA activity</b> (U/L)
<b>Control</b>	10.19±0.96	5.03±0.86	1.19±0.35	3.33±0.18
<b>Folic acid</b>	10.58±1.83	4.98±0.51	1.27±0.27	4.00±0.35
<b>Hydroxyurea</b>	10.69±2.30	6.00±0.33	1.47±0.22	2.96±0.74

Enzyme specific activities were reported as nmol of Pi released/min/mg of protein and U/L. Groups: C (control), AF (folic acid) and HU (hydroxyurea). Variables were expressed as mean ± standard error of the mean (SEM). P>0.05, with n=15 (one-way ANOVA- Dunnett's Multiple Comparison Test).

Figure 1

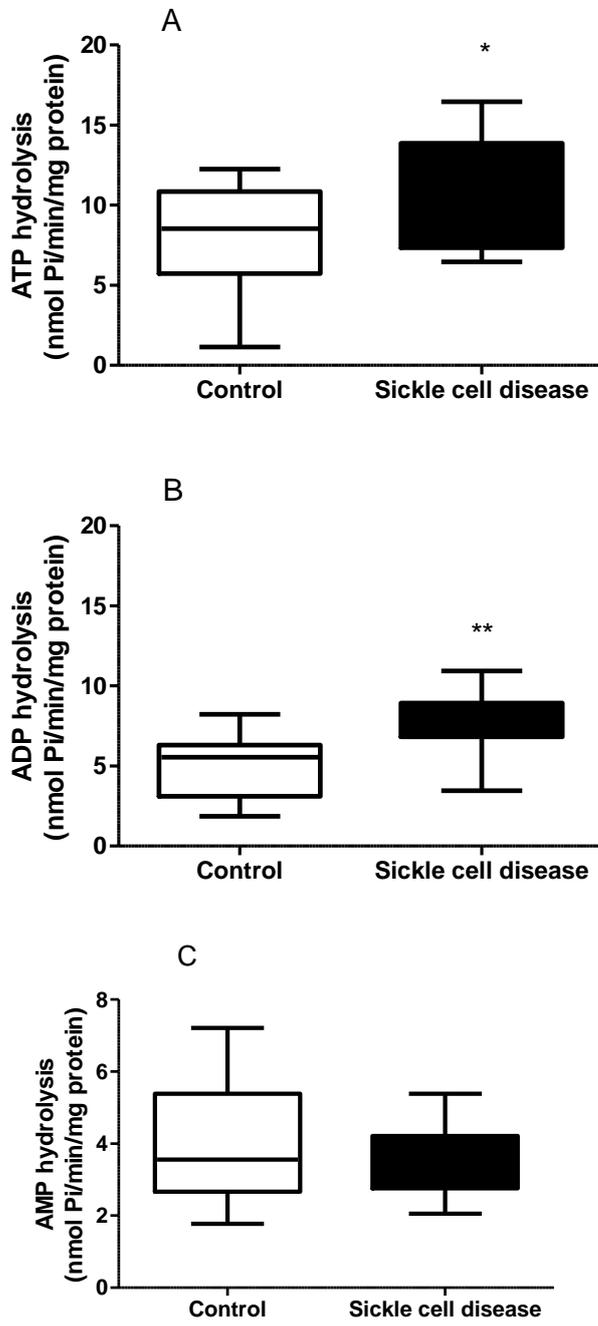


Figure 2

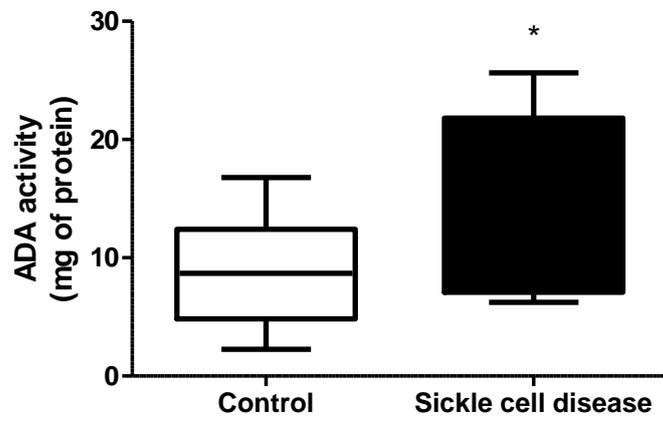
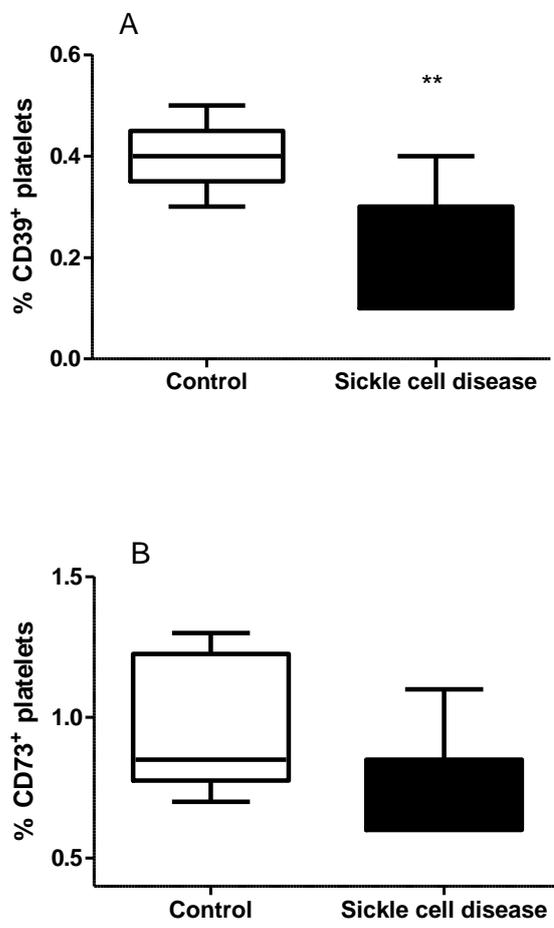


Figure 3



## 4 DISCUSSÃO

A AF é uma hemoglobinopatia caracterizada pela presença da homozigose da HbS nos eritrócitos que, mediante condições de hipóxia leva a sua polimerização. Os sintomas clínicos decorrentes da patologia iniciam mediante o declínio da concentração de HbF nos eritrócitos, sendo portanto sua taxa de extensão o principal determinante da severidade da doença (NAOUM, 2000). Em detrimento disso, os níveis de HbF nos eritrócitos dos pacientes com AF foram avaliados no presente estudo. A porcentagem de HbF mostrou-se elevada nestes pacientes quando comparado àqueles sujeitos que não apresentavam a hemoglobinopatia.

Este aumento nos níveis de HbF contribui para a redução da severidade da doença, já que acaba por diluir a concentração de HbS nos glóbulos vermelhos, reduzindo assim a sua polimerização em casos de hipóxia. Portanto, acredita-se que o aumento na porcentagem da HbF seja decorrente da terapia medicamentosa com HU utilizada como tratamento em todos os pacientes envolvidos na pesquisa, pois a mesma quando metabolizada leva à produção de óxido nítrico, estimulando diretamente a produção de cadeias  $\gamma$  globina, aumentando, conseqüentemente os níveis de HbF (PLATT, 2008).

Além da HbF, outros índices hematológicos também foram avaliados no estudo. Parâmetros como o RDW e a contagem de plaquetas mostraram-se elevados nos pacientes com AF quando comparado aos controles. Corroborando com nossos resultados Bowers e col. (2013) e Olaniyi (2014) também verificaram um aumento no número de plaquetas, alteração no RDW e um aumento no número de leucócitos quando compararam os pacientes sem alguma hemoglobinopatia com aqueles que apresentavam AF. O RDW elevado nos pacientes com AF indica a presença de anisocitose, ou seja, uma desigualdade no tamanho das hemácias, a qual é justificada pelo aumento na porcentagem de reticulócitos nesses pacientes (ARAI et al., 2011). A elevada contagem de plaquetas e leucócitos confirma a presença de um processo inflamatório, o que contribui para o agravo da patologia.

O marcador biológico de leucocitose tem sido muito associado com a severidade na doença falciforme (LITOS et al., 2007; OKPALA, 2006). O presente estudo verificou também que os pacientes com AF apresentavam um aumento no número de leucócitos quando comparado aos sujeitos controles. De acordo com Bandeira e col. (2014) os pacientes com AF apresentam um aumento no perfil inflamatório e, os leucócitos aderentes desempenham um papel direto nas oclusões vasculares causadas pelos eritrócitos falcêmicos, o qual se manifesta

pelo aumento nos níveis de citocinas inflamatórias, redução da biodisponibilidade do óxido nítrico, levando também ao desenvolvimento de estresse oxidativo (MAKIS et al., 2000).

As citocinas pró-inflamatórias têm sido apontadas como importantes sinalizadores inflamatórios. Estudos indicam que o TNF- $\alpha$  é o principal mediador da resposta aguda inflamatória e que elevados níveis estimulariam a produção de IL-6 (BILATE, 2007; REES; GIBSON, 2011). As citocinas pró-inflamatórias são produzidas por células endoteliais ativadas, plaquetas ativadas, monócitos e macrófagos presentes no local da isquemia tecidual desempenhando um papel significativo na patologia falciforme (MALAVE et al., 1993; PATHARE et al., 2004; SU et al., 1996; VILAS-BOAS et al., 2010). Lanaro e col. (2009) mencionam que a terapia com HU leva a uma diminuição nos níveis plasmáticos de TNF- $\alpha$ . O mesmo foi observado por Keikhaei et al. (2013) quando avaliaram pacientes que faziam o uso da HU com aqueles que não a utilizavam. A HU apresenta muitos efeitos benéficos já bem definidos, dentre eles o de modular a produção de citocinas, estando associada à redução nos níveis de TNF- $\alpha$  (COLELLA et al., 2012).

Em concordância com estudos anteriores, um decréscimo nos níveis de TNF- $\alpha$  circulantes também foram observados em pacientes com AF que faziam uso do medicamento HU neste presente estudo, reforçando a hipótese que a HU apresenta efeitos anti-inflamatórios, os quais apresentam efeitos benéficos aos paciente. Além da alteração nos níveis TNF- $\alpha$  nós também observamos reduzidos níveis de IL-6 nos pacientes com AF que faziam uso da terapia com HU. Este efeito provavelmente se deve aos baixos níveis de TNF- $\alpha$ , já que o mesmo é capaz de modular os níveis da IL-6.

Em resposta à hipóxia e à inflamação na patologia falciforme, padrões moleculares associados ao dano (DAMPS) são liberados de eritrócitos falcizados e outras células endoteliais danificadas do meio intra para o meio extracelular, entre eles o ATP e ADP (GLADWIN; OFORI-ACQUAH 2014; SUN; XIA, 2013). Em decorrência disto, nosso trabalho também investigou a atividade da E-NTPDase, E-5' nucleotidase e E-ADA, as quais são enzimas que se encontram ancoradas na membrana de linfócitos e plaquetas e, responsáveis pelo controle dos níveis fisiológicos destes nucleotídeos e nucleosídeo no meio extracelular.

Um aumento na atividade da E-NTPDase (hidrólise do ATP e ADP) foi observado tanto nas plaquetas quanto nos linfócitos dos pacientes AF. Isto já era esperado uma vez que a E-NTPDase é conhecida como uma enzima chave que desempenha um papel importante na inflamação e na tromborregulação. Este aumento em sua atividade leva a um aumento na hidrólise dos nucleotídeos ATP e ADP liberados durante os casos de hipóxia com o intuito de

manter seus níveis fisiológicos, já que elevadas concentrações de ATP no meio extracelular acabariam contribuindo para um maior dano tecidual e inflamatório. Neste sentido, a E-NTPDase, que é a maior promotora da inibição plaquetária via metabolismo do ATP e ADP, estaria também reduzindo o recrutamento e a ativação plaquetária.

Além da atividade da E-NTPDase, o presente estudo também avaliou a expressão desta enzima nas plaquetas de pacientes com AF. Pôde-se observar que a porcentagem de plaquetas que expressam CD39 mostrou-se reduzida nestes pacientes quando comparado ao grupo controle, o que pode estar diretamente relacionado a terapia medicamentosa (HU) utilizada por estes pacientes. Portanto, sugere-se que a HU possa estar modulando a expressão da CD39 nas plaquetas, pois este dado vem de encontro com o trabalho de Silva-Pinto e col. (2014) onde os mesmos observaram uma redução na porcentagem de células linfócitos T e células T reguladoras (Tregs) que expressam CD39 em de pacientes com AF e que faziam uso da HU quando comparado com aqueles que não faziam uso da HU e com pacientes controle. Além disso uma redução da expressão da CD73 em células NK de pacientes tratados com HU também foi observado. De acordo com Koziak (1999) a atenuação da expressão da CD39 em plaquetas está associada com a ativação plaquetária e a formação de trombos, portanto podemos sugerir que a redução da expressão da CD39 possa ser um fator que contribui indiretamente com os processos vaso-oclusivos ocorridos na patologia falciforme.

Nos casos de hipóxia e inflamação, o aumento na produção de adenosina dos seus precursores moleculares ocorre na tentativa de alterar o equilíbrio da sinalização pro-inflamatória desencadeada pelo ATP em direção à sinalização anti-inflamatória da adenosina (POTH et al., 2013). No nosso estudo, observamos um aumento na atividade da E-NTPDase nos linfócitos de pacientes com AF, tanto para a hidrólise do ATP quando do ADP. Já que as enzimas do sistema purinérgico atuam em cascata e que a atividade da E-5'-nucleotidase não foi avaliada nos linfócitos de pacientes com AF, nós podemos sugerir que sua atividade também esteja aumentada, resultando em uma quantidade aumentada de adenosina no meio extracelular a fim de compensar os efeitos pró-inflamatórios e agregantes da sinalização das moléculas de ATP e ADP.

A E-5'-nucleotidase é uma importante enzima com capacidade de catalisar a desfosforilação do nucleotídeo AMP em nucleosídeo no meio extracelular, tendo o nucleotídeo AMP como substrato preferido para geração de adenosina (COLGAN, et al.; 2006; HASKÓ; CRONSTEIN, 2004; YEGUTKIN, 2008). Já nas plaquetas, a atividade da E-5'-nucleotidase foi avaliada, porém a hidrólise do nucleotídeo AMP não mostrou-se alterada, ou seja, nenhuma

diferença significativa foi observada na atividade desta enzima em plaquetas de pacientes com AF quando comparado com o grupo controle.

Em decorrência do aumento na atividade da E-NTPDase (hidrólise do ATP e ADP) em plaquetas de pacientes com AF, pode-se sugerir que uma quantidade de AMP está sendo gerada para além de seus níveis fisiológicos. Um possível aumento dos níveis de AMP nos leva a pensar que o mesmo pode estar sendo reconvertido à adenosina difosfato (ADP), pois um consequente aumento na atividade da E-5' nucleotidase não foi observado. Isso pode ser sugerido pelo fato de que certa quantidade de adenilato quinase (AK1) é liberada de plaquetas, glóbulos vermelhos, células endoteliais e circula livremente no sangue, regulando o anabolismo do ADP (HASLAM; MILLS, 1967; YEGUTKIN et al., 2007, 2012). Portanto, este possível aumento de ADP gerado pela AK1 poderia também estar contribuindo para o aumento da agregação plaquetária nos pacientes com AF, já que o ADP é conhecido como um indutor da agregação plaquetária e as plaquetas destes pacientes são conhecidas por circular em estado ativado, apresentando alterada agregação plaquetária.

A adenosina, é um purino nucleosídeo gerado da desfosforilação consequente do ATP, através da ação consecutiva da E-NTPDase e E-5'-nucleotidase, como também pode ser encontrada no meio extracelular por ser liberada pelas células endoteliais nos casos de hipóxia (MARSHALL, 2000). Elevados níveis de adenosina têm sido identificados no plasma de pacientes com AF (ZHANG et al., 2011), portanto quando se avaliou a atividade da E-ADA no presente estudo, já era esperado que a mesma se encontrasse elevada nestes pacientes. Um aumento da E-ADA tanto nos linfócitos quanto nas plaquetas foi observado, levando a um aumento na produção de inosina extracelular, a qual apresenta atividade antiplaquetária, ajudando assim na prevenção da formação de trombos e no processo isquêmico (FUENTES et al., 2014; HSIAO et al., 2005). Ademais, a inosina é um nucleosídeo com propriedade anti-inflamatória sendo capaz também de suprimir o TNF- $\alpha$  (HASKO et al., 2000). Como a atividade da E-ADA mostrou-se aumentada nos pacientes com AF e que a inosina apresenta a propriedade de suprimir o TNF- $\alpha$ , isto também pode ter uma relação direta com o decréscimo nos níveis de TNF- $\alpha$  encontrado no soro dos pacientes com AF no presente estudo.

O aumento na atividade da E-ADA nos pacientes com AF vem a contribuir positivamente, uma vez que o excesso nos níveis extracelulares de adenosina é identificado como a causa principal do desenvolvimento de priapismo (processo de ereção prolongada e dolorosa do pênis sem estímulo sexual) nestes pacientes, relevando assim o papel negativo da adenosina na doença falciforme. Além do mais, o aumento nos níveis de adenosina extracelular

levaria à estimulação dos receptores ADORA2B promovendo a falcização dos eritrócitos por induzir a produção de 2,3-DPG, o qual reduz a afinidade do oxigênio pela hemoglobina (NARITA et al., 1981; SASAKI; CHIBA, 1983). Para os pacientes com AF esse aumento da adenosina circulante se tornaria, portanto, prejudicial por reduzir a afinidade do oxigênio com a HbS fazendo com que facilite o aumento da polimerização da deoxi-HbS e conseqüentemente a indução da falcização dos eritrócitos.

Em decorrência de tudo que foi mencionado anteriormente, e para se ter certeza de que todas estas atividades enzimáticas investigadas no presente estudo são decorrentes da própria patologia falciforme, investigou-se também, por meio de ensaios *in vitro*, se as medicações utilizadas por estes pacientes (ácido fólico e a HU) poderiam modular a atividade da E-NTPDase, E-5'-nucleotidase e E-ADA nos linfócitos e plaquetas dos pacientes com AF. Os resultados encontrados nos mostram que ambas medicações não interferem na atividade das ecto-enzimas, confirmando portanto, que a terapia utilizada pelos sujeitos da pesquisa não interfere na hidrólise dos nucleotídeos e nucleosídeo da adenina.

Em suma, a regulação dos nucleotídeos através das enzimas E-NTPDase e E-ADA em resposta à hipóxia e à inflamação, representa um importante controle na regulação da concentração das purinas no meio extracelular na patologia falciforme. Além disso, a adenosina desaminase foi capaz de reduzir os níveis de adenosina no meio extracelular contribuindo para a redução da falcização dos eritrócitos e conseqüentemente redução de danos aos órgãos. Com isso, podemos afirmar que as ectoenzimas do sistema purinérgico estão envolvidas e desempenham um papel muito importante nos processos inflamatórios e vaso-oclusivos decorrentes da falcização dos eritrócitos. A alteração na atividade destas em células do sistema imune, tais como linfócitos e plaquetas só vem a contribuir para a melhora e reversão do processo inflamatório e vaso-oclusivo.

## 5 CONCLUSÕES

- O aumento na atividade da E-NTPDase em linfócitos de pacientes com AF representa um importante controle da mediação das purinas no processo inflamatório, promovendo a regulação dos nucleotídeos extracelulares liberados em resposta à hipóxia e a inflamação na doença falciforme. Já a atividade exercida pela E-NTPDase presente nas plaquetas, induz a um equilíbrio destes nucleotídeos a nível extracelular com conseqüente redução do recrutamento e ativação plaquetária, exercendo um efeito direto na prevenção e formação de trombos na doença falciforme.
- A elevada atividade da E-ADA observada nos linfócitos e plaquetas de pacientes com AF vem a contribuir para a redução do excesso de adenosina presente no meio extracelular, a qual em elevadas concentrações é considerada prejudicial na patologia falciforme. Além disso, o aumento na atividade da E-ADA favorece a produção de inosina, contribuindo assim para a prevenção de trombos e processo isquêmico.
- Os fármacos HU e ácido fólico não interferiram na atividade das ectoenzimas (E-NTPDase, E-5' nucleotidase e E-ADA) em linfócitos e plaquetas, confirmando portanto, que a terapia utilizada pelos sujeitos da pesquisa não interfere na hidrólise dos nucleotídeos e nucleosídeo da adenina.
- A redução na porcentagem de plaquetas que expressam a enzima CD39 nas plaquetas dos pacientes com AF pode ser um fator contribuinte para os processos vaso-oclusivos ocorridos na patologia falciforme.
- O perfil de citocinas nos pacientes com AF tratados foi modificado com a utilização da terapia com HU, no intuito de reduzir a resposta pró-inflamatória e prevenir as crises vaso-oclusivas.

## **6 PERSPECTIVAS**

Outros estudos pretendem ser conduzidos pelo nosso grupo de pesquisa, a fim de discutir melhor os resultados apresentados até o momento. Pretende-se ainda quantificar os nucleotídeos e nucleosídeo da adenina no soro, quantificar o óxido nítrico, verificar a agregação plaquetária, determinar a expressão dos receptores P2X7 e ADORA2B nos pacientes com AF. Estuda-se ainda a possibilidade de realização de testes de estresse oxidativo.

## REFERÊNCIAS

- ACCIOLY, J. Anemia falciforme. **Arq. Univ. Bahia.**, v.1, p.169, 1947.
- ADRAGNA, N.C.; FONSECA, P.; LAUF, P.K. Hydroxyurea affects cell morphology, cation transport, and red blood cell adhesion in cultured vascular endothelial cells. **Blood**, n.83, p.553–560, 1994.
- ARAI, M. et al. Reticulocytogram in patients with sickle cell anemia and hemoglobin SC disease. **Biol. Health Sci.**, v.17, n.1, p.53-58, 2011
- ARAN, J.M. et al. Presence of adenosine deaminase on the surface of mononuclear blood cells: immunochemical localization using light and electron microscopy. **J. Histochem. Cytochem.**, v.39, p.1001-1008, 1991.
- ATAGA, K.I. et al. Coagulation activation and inflammation in sickle cell disease associated pulmonary hypertension. **Haematologica**, v.93, p.20-26, 2008.
- ATKINSON, B. et al. Ectonucleotidases of the CD39/NTPDase family modulate platelet activation and thrombus formation: potential as therapeutic targets, **Blood Cells Mol. Dis.** v.36, p.217–222, 2006.
- BAGATINI, M.D. et al. Hydrolysis of adenine nucleotides in platelets from patients with acute myocardial infarction. **Clin. Biochem.**, v.41, n.14, p.1181-1185, 2008.
- BAIN, B.J. **Haemoglobinopathy Diagnosis**. 2nd. Ed. Blackwell Publishing Ltdp.1-25, 2006.
- BANDEIRA, F.M.; 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. Pediatria**, n.75, p.167-71, 1999.
- BANDEIRA et al. Hidroxiuréia em pacientes com síndromes falciformes acompanhados no hospital Hemope, Recife-PE. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, v.26, n.3, p.189-194, 2004.
- BANDEIRA, I.C. et al. Chronic inflammatory state in sickle cell anemia patients is associated with HBB\*S haplotype. **Cytokine**, v.65, p.217–221, 2014.
- BARSOTTI, C.; IPATA, P.L. Metabolic regulation of ATP breakdown and of adenosine production in rat brain extracts. **Int. J. Biochem. Cell Biol.**, v. 36, n.11, p.2214-2225, 2004.
- BRASIL - Ministério da Saúde. **Doença falciforme: condutas básicas para tratamento**. Brasília, Distrito Federal, 2012. Disponível em: Acesso em 07/11/14.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de ações Programáticas Estratégicas. Coordenação Geral de Saúde das Mulheres. **Inserção da eletroforese de hemoglobina nos exames de pré-natal**, 2013.
- BELCHER, J.D. et al. Transgenic sickle mice have vascular inflammation. **Blood**, v.101, p.3953-3959, 2003.

- BIGONNESSE, F. et al. Cloning and characterization of mouse triphosphate diphosphohydrolase 8. **Biochemistry**, v.43, n.18, p.5511-5519, 2004.
- BILATE, A.M.B. Inflamação, citocinas, proteínas de fase aguda e implicações terapêuticas. **Temas. Reumat. Cl.**, v.8 p.47–51, 2007.
- BIRK, A.V. et al. Role of extracellular ATP metabolism in regulation of platelets reactivity. **J. Lab. Clin. Med.**, n.140, p.166-175, 2002.
- BODAS, P. et al. The prevalence of hypertension and abnormal kidney function in children with sickle cell disease – a cross sectional review. **BMC Nephrology**, v.14, p.237, 2013.
- BOROWIEC, A. et al. Adenosine as a metabolic regulator of tissue function: production of adenosine by cytoplasmic 5'-nucleotidase. **Acta Biochim. Pol.**, v.53, p.53:269-278, 2006.
- BOURS, M. et al. Adenosine 5'-triphosphate and adenosine as endogenous signaling molecules in immunity and inflammation. **Pharmacol. Ther.**, v.112, p.358–404, 2006.
- BOWERS, A.S. et al. Blood viscosity and the expression of inflammatory and adhesion markers in homozygous sickle cell disease subjects with chronic leg ulcers, **PLoS One**, v.8, p.e68929, 2013.
- BUNN, H.F.; FORGET, B.G. **Hemoglobin: Molecular, genetic and clinical aspects**. PHILADELPHIA: W.B. SANDERS COMPANY. P.690, 1986.
- BURNSTOCK, G.; KNIGHT, G.E. Cellular distribution and functions of P2 receptors subtypes in different systems. **Int. Rev. Cytol.**, v.240, p.31-304, 2004.
- BURNSTOCK, G. Physiology and pathophysiology of purinergic neurotransmission. **Physiol. Rev.**, n.87, p.659-797, 2007.
- CANÇADO, R.D. et al. Clinical protocol and therapeutic guidelines for the use of hydroxyurea in sickle cell disease. **Rev. Bras. Hematol. Hemother.**, v.5, p.361–366, 2009.
- CHIRICO, E.; PIALOUX, V. Role of oxidative stress in the pathogenesis of sickle cell disease. **Life**, v.64, n.1, p.72-80, 2012.
- CINEL, I.; OPAL, S.M. Molecular biology of inflammation and sepsis: a primer. **Crit. Care Med.**, n.37, p.291–304, 2009.
- COLELLA, M.P. Hydroxyurea is associated with reductions in hypercoagulability markers in sickle cell anemia. **J. Thromb. Haemost.**, v.10, p.1967–1970, 2012.
- COLGAN, S.P. et al. Physiological roles for ecto-5'-nucleotidase (CD73). **Purinergic Signal.**, v.2, n.2, p.351-60, 2006.
- COSTA, F.F. **Anemia Falciforme**. In: Zago MA, Falcão RP, Pasquini R. Hematologia. Fundamentos e Prática. 1ª ed. Rio de Janeiro: Atheneu; 2001. p. 289-307.
- CRONSTEIN, B.N. Adenosine, an endogenous anti-inflammatory agent. **J. Appl. Physiol.**, v.76, p.5-13, 1994.

- CUNHA, R.A. Adenosine as a neuromodulator and as a homeostatic regulator in the nervous system: different roles, different sources and different receptors. **Neurochem. Int.**, v.38, n.2, p.107-25, 2001.
- DE FRANCESCHI, CAPPELLINI, L.; OLIVIERI, M.D. Trombosis and sickle cell disease. **Semin. Thromb. Hemost.**, v.37, p.226-236, 2011.
- DI VIRGILIO, F. Et al. Nucleotide receptors: an emerging family of regulatory molecules in blood cells. **Blood**, v.97, n.3, p.587-600, 2001.
- DUCATTI, R.P. et al. Investigação de hemoglobinopatias em sangue de cordão umbilical de recém-nascidos do Hospital de Base de São Jose do Rio Preto. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, v.23, n.1, p. 23-29, 2001.
- ELTZSCHIG, H.K. et al. Coordinated adenine nucleotide phosphohydrolysis and nucleoside signaling in posthypoxic endothelium: role of ectonucleotidases and adenosine A2B receptors. **J. Exp. Med.**, v.198, p.783–796, 2003.
- ESMON, C.T. The interactions between inflammation and coagulation. **Br. J. Haematol.**, n.131, p.417–430, 2005.
- FAVALORO, E.J. Differential expression of surface antigens on activated endothelium. **Immunol. Cell Biol.**, v. 71, p. 571-581, 1993.
- FERRAZ, F.N.; WEILER, E.B. Uma abordagem sobre o uso da hidroxiuréia e do transplante de células-tronco hematopoéticas no tratamento da anemia falciforme. **Arq. Ciênc. Saúde.**, v.16, n.1, p.51-58, 2012.
- FINNEGAN, M.E. et al. Adherent leukocytes capture sickle erythrocytes in an in vitro flow model of vaso-occlusion. **Am. J. Hematol.**, 82, p.266-75, 2007.
- FOLSOM, A.R. et al. Prospective study of sickle cell trait and venous thromboembolism incidence. **J. Thromb. Haemost.**, v.13, p.2–9, 2015.
- FRANCO, R. et al. Cell surface adenosine deaminase: much more than na ectoenzyme. **Prog. Neurobiol.**, v.52, p.283-294, 1997.
- FRENETTE, P.S. Sickle cell vaso-occlusion: multistep and multicellular paradigm. **Curr. Opin. Haematol.**, v.9, p.101-106, 2002.
- FRENETTE, P.S.; ATWEH G.F. Sickle cell disease: old discoveries, new concepts, and future promise. **J. Clin. Invest.**, v.117, n.4, p.850-858, 2007.
- FUENTES, E. et al. Inhibition of platelets activation and thrombus formation by adenosine and inosine: studies on their relative contribution and molecular modeling. **PloS One**, v.9, n.11, p.[e112741], 2014.
- GALIZA NETO, G.C.; PITOMBEIRA, M.S. Aspectos moleculares da anemia falciforme. **J. Bras. Patol. Med. Lab.**, Rio de Janeiro, v.39, n.1, p.51-56, 2003.

GLADWIN, M.T. OFORI-ACQUAH, S.F. Erythroid DAMPs drive inflammation in SCD. **Blood**, v.123, p.3689–3690, 2014.

GODING, J.W. Ecto-enzymes: physiology meets pathology. **J. Leukoc. Biol.**, v.67, p.285-311, 2000.

GREEN NS; BARRAL S. Emerging Science of Hydroxyurea Therapy for Pediatric Sickle Cell Disease. **Pediatr. Res.**, v.75, p.196-204, 2014.

GORELL, M.D.; GYSBERS, V.; MC CAUGHAN, G.W. CD26: a multifunctional integral membrane and secreted protein of activated lymphocytes. **Scand. J. Immunol.**, v.54, p.249-264, 2001.

GUIMARÃES, C.T.L.; COELHO, G.O. A importância do aconselhamento genético na anemia falciforme. **Ciênc. saúde coletiva**, v.15, n.1, p.1733-1740, 2010.

HAHN, E.W.; GILLESPIE, E.B. Report of a case greatly improved by splenectomy. Experimental study of sickle cell formation. **Arch. Intern. Med.**, v.39, p.233, 1927.

HASKÓ G.; CRONSTEIN B.N. Adenosine: an endogenous regulator of innate immunity. **Trends Immunol.**, v.25, n.1, p.33-9, 2004.

HASKÓ, G. et al. Adenosine inhibits IL-12 and TNF- $\alpha$  production via adenosine A2a receptor-dependent and independent mechanisms. **FASEB J.**, v.14, n.13, 2000.

HASLAM, R.J.; MILLS, D. C. The adenylate kinase of human plasma, erythrocytes and platelets in relation to the degradation of adenosine diphosphate in plasma. **Biochem. J.**, v.103, p.773–784, 1967.

HAYNES, J.R. et al. Hydroxyurea attenuates activated neutrophil-mediated sickle erythrocyte membrane phosphatidylserine exposure and adhesion to pulmonary vascular endothelium. **Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.**, v.294, p.H379-385, 2008.

HEBBEL, R.P.; OSAROGIAGBON, R.; KAUL, D. The endothelial biology of sickle cell disease: inflammation and a chronic vasculopathy. **Microcirculation**, n.11, p.129–151, 2004.

HEBBEL, R.P.; VERCELLOTTI, G.M.; NATH, K.A. A systems biology consideration of the vasculopathy of sickle cell anemia: the need for multi-modality chemo-prophylaxis. **Cardiovasc. Hematol. Disord. Drug Targets**, v.4, n.9, p.271-292, 2009.

HSIAO, G. et al. Protective mechanisms of inosine in platelets activation and cerebral ischemic damage. **Arter. Thromb. Vasc. Biol.**, v.25, n.9, p.1998-2004, 2005.

HUNSUCKER, S.A.; MITCHELL, B.S.; SPYCHALA, J. The 5'-nucleotidase as regulators of nucleotide and drug metabolism. **Pharmacol. Ther.**, v.107, n.1, p.1-30, 2005.

INGRAM, V.M. A specific difference between the globins of normal human and sickle cell anemia hemoglobins. **Nature**, n.178, p.792, 1956.

- INÍGUEZ, E.D. et al. Detección precoz neonatal de anemia falciforme y otras hemoglobinopatías en la comunidad autónoma de Madrid. Estudio piloto. **An. Pediatr.**, n.58, p.146-55, 2003.
- IWAKI-EGAWA, S.; YAMAMOTO, T.; WATANABE, Y. Human plasma adenosine deaminase 2 is secreted by activated monocytes. **Biol. Chem.**, v. 387, p. 319-321, 2006.
- JACOB, F. et al. Purinergic signaling in inflammatory cells: P2 receptor expression, functional effects, and modulation of inflammatory responses. **Purinergic Signal.**, 2013.
- JACOBSON, K.A.; GAO, Z.G. Adenosine receptor as therapeutic targets. **Nat. Rev. Drug Discov.**, v.5, p.247-264, 2006.
- JUNGER, W.G. Immune cell regulation by autocrine purinergic signalling. **Nat. Rev. Immunol.**, v.11, n.3, p.201-212, 2011.
- KANSAS, G.S.; WOOD, G.S.; TEDDER, T.F. Expression, distribution, and biochemistry of human CD39. Role in activation-associated homotypic adhesion of lymphocytes. **J. Immunol.**, v. 146, p. 2235–2244, 1991.
- KASSIM, A. A.; DEBAUN, M.R. Sickle cell disease, vasculopathy and therapeutics. **Annu. Rev. Med.**, v.6, p.451-466, 2013.
- KEIKHAEI, B. et al. Altered levels of pro-inflammatory cytokines in sickle cell disease patients during vaso-occlusive crises and the steady state condition, 5, Eur. **Cytokine, Netw.**, v.24, p.45–52, 2013.
- KIEFMANN, R. et al. Red blood cells induce hypoxic lung inflammation. **Blood**, n.111, p.5205–5214, 2008.
- KONG, T. HIF-dependent induction of adenosine A2B receptor in hypoxia. **Faseb J.**, v.20, p.2242–2250, 2006.
- KOZIAK, K. Analysis of CD39/ATP diphosphohydrolase (ATPDase) expression in endothelial cells, platelets and leukocytes. **Thromb. Haemost.**, v.82, p.1538–1544, 1999.
- KUKULSKI, F. et al. Comparative hydrolysis of P2 receptor agonist by NTPDase 1,2,3 and 8. **Purinergic Signal.**, v.1, p.193-204, 2005.
- LANARO, C.F. et al. Altered levels of cytokines and inflammatory mediators in plasma and leucocytes of sickle cell anemia patients and effects of hydroxyurea therapy. **J. leucoc. Boil.**, v.85, 2009.
- LATINI, S.; PEDATA, F. Adenosine in the central nervous system: release mechanisms and extracellular concentrations. **J. Neurochem.**, v.79, n.3, p.463-484, 2001.
- LEAL, D.B. et al. HIV infection is associated with increased NTPDase activity that correlates with CD39-positive lymphocytes. **Biochim. Biophys. Acta**, v.1746, n.2, p.129-134, 2005.
- LISTER, M.F. et al. The role of the purinergic P2X7 receptor in inflammation. **J. Inflamm. (London England)**, v.4, p.542–548, 2007.

- LITOS, M. et al. White blood cell count as a predictor of the severity of sickle cell disease during pregnancy. **Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.**, v.133, p.169–172, 2007.
- LOOMIS, W.H. et al. Hypertonic stress increases T cells interleukin-2 expression through a mechanism that involves ATP release, P2 receptor, and p38 MAPK activation. **J. Biol. Chem.**, v.278, p.4590–4596, 2003.
- LOPPNOW, H. et al. Platelet-derived interleukin-1 induces cytokine production, but not proliferation of human vascular smooth muscle cells. **Blood**, v.91, p.134–139, 1998.
- LUNKES, G. et al. Enzymes that hydrolyze adenine nucleotides in diabetes and associated pathologies. **Thromb. Res.**, v.109, n.4, p.189-194, 2003.
- MALAVÉ, I. et al. Level of tumor necrosis factor alpha/cachectin (TNF alpha) in serum from patients with sickle cell disease. **Acta Haematol.**, v.90, p.172–176, 1993.
- MALISZEWSKI, C.R. et al. The CD39 lymphoid cell activation antigen: molecular cloning and structural characterization. **J. Immunol.**, v. 153, p. 3574-3583, 1994.
- MARCUS, J.A. et al. Metabolic control of excessive extracellular nucleotide accumulation by CD39/Ectonucleotidase-1: implications for ischemic vascular diseases. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v.305, p.9-16, 2003.
- MAKIS, A.C. HATZIMICHAEL, E.C. BOURANTAS, K.L. The role of cytokines in sickle cell disease. **Ann. Haematol.**, v.79, p.407–413, 2000.
- MARSHALL, J.M. Adenosine and muscle vasodilatation in acute systemic hypoxia. **Acta Physiol. Scand.**, v.168, p.561–573, 2000.
- MEHTA, V.B.; HART, J.; WEWERS, M.D. ATP-stimulated release of interleukin (IL)-1beta and IL-18 requires priming by lipopolysaccharide and is independent of caspase-1 cleavage. **J. Biol. Chem.**, v.276, p.3820–3826, 2001.
- NAOUM, P.C. **Distribuição geográfica das hemoglobinopatias.** In: Naoum PC - Hemoglobinopatias e Talassemias. São Paulo: Sarvier, p.137-43, 1997.
- NAOUM, P.C. Interferentes eritrocitários e ambientais na anemia falciforme. **Rev. Bras. Hematol. e Hemoter.**, n.22, v.1, p.05-22, 2000.
- NARITA, H. et al. Synthesis of 2,3-bisphosphoglycerate synthase in erythroid cells. **J. Biol. Chem.**, v.256, p.7059–7063, 1981.
- OLANIYI, J.A. et al. Serum iron status and haematological profiles in adult Nigerian sickle cell anaemia patients. **Int. J. Trop. Dis. Health**, v.4, p.917–927, 2014.
- OKPALA, I. Leukocyte adhesion and the pathophysiology of sickle cell disease. **Curr. Opin. Hematol.**, v.13, p.40–44, 2006.
- PALLIS, F.R. **Avaliação funcional dos eosinófilos na anemia falciforme e o efeito do tratamento com hidroxiuréia.** Dissertação (Mestrado em Ciências Médicas) – Programa de

Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, 2011.

PATHARE, A. Cytokine profile of sickle cell disease in Oman. **Am. J. Haematol.**, v.77, p.323–328, 2004.

PAULING, L. et al. Sickle-cell anemia, a molecular disease. **Science**, v.110, p.543-548, 1949.

PELIZARO, B.I. et al. Hydroxyurea in the sickle cell anemia: toxicity and effectiveness. **JNUOL**, v.6, n.8, p.1864-1870, 2012.

PERUTZ, M.F. et al. Structure of haemoglobin: a three-dimensional Fourier synthesis at 5-5Å resolution obtained by x-ray analysis. **Nature**, v.185, p.416-422, 1960.

PLATT, O.S. Hydroxyurea for the treatment of sickle cell anemia. **N. Engl. J. Med.**, v.358, n.13, p.1362-1369, 2008.

PODACK, E.R.; YOUNG, J.; COHN, Z.A. Isolation and biochemical and functional characterization of perforin 1 from cytolytic T cell granules. **Proc. Natl. Acad. Sci USA**, v.82, n.24, p.8629-8633, 1985.

POTH, J.M. et al. Transcriptional control of adenosine signaling by hypoxia-inducible transcription factors during ischemic or inflammatory disease. **J. Mol. Med.**, v.91, p.183–193, 2013.

RAGHUPATHY, R. et al. Th1 and Th2 Cytokine Profiles in Sickle Cell Disease. **Acta Haematol.**, v.103, p.197–202, 2000.

RALEVIC, V.; BURNSTOCK, G. Receptors for Purines and Pyrimidines. **Pharmacol. Rev.**, v. 50, n.3, p. 413-492, 1998.

REES, D.C.; GIBSON, J.S. Biomarkers in sickle cell disease. **Br. J. Haematol.**, v.156, n.4, p.433-445, 2011.

REES, D.C.; WILLIAMS, T.N.; GLADWIN, M.T. Sickle-cell disease. **The Lancet**, v.376, 2010.

RESTA, R.; YAMASHITA, Y.; THOMPSON, L.F. Ecto-enzyme and signaling functions of lymphocyte CD73. **Immunol. Rev.**, v.161, p.95-109, 1998.

RIBEIRO, R.C.M. et al. Importancia da avaliação da hemoglobina fetal na clínica da anemia falciforme. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, v.30, n.2, p.136-141, 2008.

ROBSON, S.C. et al. Ectonucleotidases of CD39 family modulate vascular inflammation and thrombosis in transplantation. **Semin. Thromb. Hemost.**, v.31, p.217-33, 2005.

ROBSON, S.C.; SÉVIGNY, J.; ZIMMERMANN, H. The NTPDase family of ectonucleotidases: structure function relationship and pathophysiological significance. **Purinergic Signal.**, v.2, n.2, p.409-430, 2006.

SASAKI, R.; CHIBA, H. Role and induction of 2,3-bisphosphoglycerate synthase. **Mol. Cell. Biochem.**, v.53, p.247–256, 1983.

SCHNOG, J.B. et al. ADAMTS13 activity in sickle cell disease. **Am. J. Hematol.**, v.81, n.7, p.492–498, 2006.

SHAROYAN, S. et al. Influence of dipeptidyl peptidase IV on enzymatic properties of adenosine deaminase. **Acta Biochim. Pol.**, v.53, n.3, p.539-546, 2006.

SHI, J. et al. Molecular cloning and characterization of a novel mammalian endo apyrase. **J. Biol. Chem.**, v.276, n.20, p.17474-17478, 2001.

SILLA, L.M.R. Doença falciforme: um grave e desconhecido problema de saúde pública no Brasil. **J. Pediatr. (Rio J.)**, n.75, p.145-6, 1999.

SMITH, R.A.; ALVAREZ, A.J.; ESTES, D.M. The P2X7 purinergic receptor on bovine macrophages mediates mycobacterial death. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v.78, p.249–262, 2001.

SMITH, W.R. et al. The association between hydroxyurea treatment and pain intensity, analgesia use and utilization in ambulatory sickle cell anemia patients. **Pain Med.**, v. 12, p. 697-705, 2011.

SILVA-PINTO, A.C. et al. Hydroxycarbamide modulates components involved in the regulation of adenosine levels in blood cells from sickle-cell anemia patients. **Ann. Hematol.**, v.93, p.1457-65, 2014.

SOSLAU, G.; YOUNGPRAPAKORN, D. A possible dual physiological role of extracellular ATP in the modulation of platelet aggregation. **Biochim. Biophys. Acta**, v.1355, p.131-140, 1997.

SPANEVERELLO, R.M. et al. The activity and expression of NTPDase is altered in lymphocytes of multiple sclerosis patients. **Clin. Chim. Acta**, v.411, n.3, p.210-214, 2010.

SPYCHALA, J.; MITCHEL, B.S.; BARANKIEWICZ. Adenosine metabolism during phorbol myristate acetate-mediated induction of HL-60 cell differentiation: changes in expression pattern of adenosine kinase, adenosine deaminase and 5'-nucleotidase. **J. Imm.**, v.158, p.158:4947-4952, 1997.

STEINBERG, M.H. **Pathophysiology of sickle cell disease.** In: Sickle cell disease and thalassaemia. Editor: G. P. Rodgers, London, Balliere Tindall Ed., p.168, 1998.

STEINBERG, M.H. **Management of Sickle Cell Disease.** N. Engl. J. Med., v.340, p.1021-1030, 1999.

STEINBERG, M.; NAGEL, R. **New and recombinant mutant hemoglobins of biological interest. Disorders of hemoglobin: genetics, pathophysiology, and clinical management.** CAMBRIDGE UNIVERSITY PRESS, CAMBRIDGE, P.1195-1211, 2001.

STEINBERG, M.H. Sickle cell anemia, the first molecular disease: overview of molecular etiology, pathophysiology, and therapeutic approaches. **Sc. World J.**, v.8, p.1295-1324, 2008.

- STUART, M.J.; SETTY, B.N. Acute chest syndrome of sickle cell disease: new light on an old problem. **Curr. Opin. Hematol.**, v.8, n.2, p.111-22, 2001.
- SU, S.B.; MUKAIDA, N.; MATSUSHIMA, K. Rapid secretion of intracellular pre-stored interleukin-8 from rabbit platelets upon activation. **J. Leukoc. Biol.**, v.59, p.420–426.24, 1996.
- SUN, K.; XIA, Y. New insights into sickle cell disease: a disease of hypoxia. **Curr. Opin. Hematol.**, v.20, n.3, 2013.
- TOMER, A. et al. Thrombogenesis in sickle cell disease. **J. Lab. Clin. Med.**, v.137, p.398–407, 2001.
- TSUBOI, I. et al. Adenosine deaminase isoenzyme levels in patients with human T-cell lymphotropic virus Type 1 and human immunodeficiency virus Type 1 infections. **Clin. Diagn. Lab. Immunol.**, v.2, p.626-630, 1995.
- UNGERER, J.P.J. et al. Serum adenosine deaminase: isoenzyme and diagnostic application. **Clin. Chem.**, v.38, p.1322-1326, 1992.
- VERNON M.I. Sickle-cell anemia hemoglobin: the molecular biology of the first “molecular disease” – The crucial importance of serendipity. **Genetics**, v.67, p.1-7, 2004.
- VILAS-BOAS, W. et al. Arginase levels and their association with Th17-related cytokines, soluble adhesion molecules (sICAM-1 and sVCAM-1) and hemolysis markers among steady-state sickle cell anemia patients. **Ann. Haematol.**, v.89, p.877–882, 2010.
- WEATHERAL, D.J.; CLEGG, J. B. **The thalassemia syndromes**. Blackwell Scientific Publication, Oxford, 3rd Ed. (1981).
- WEATHERALL, D.J.; CLEGG, J.B. Inherited haemoglobin disorders: an increasing global health problem. **Bull. World Health Organ.**, v.79, n.8, p.704-712, 2001.
- WESTERMAN, M.P. et al. Coagulation changes in individuals with sickle cell trait. **Am. J. Hematol.**, n.69, p.89-94, 2002.
- WICK, T.M. et al. Unusually large von Willebrand factor multimers preferentially promote young sickle and nonsickle erythrocyte adhesion to endothelial cells. **Am. J. Hematol.**, v.42, n.3, p.284–292, 1993.
- XU, X.S.; HONG, X.; WANG, G. Induction of endogenous  $\gamma$ -globin gene expression with decoy oligonucleotide targeting Oct-1 transcription factor consensus sequence. **J. Hematol. Oncol.**, v.2, n.15, p.1-11, 2009.
- YEE, D.L. et al. Thromboelastographic and hemostatic characteristics in pediatric patients with sickle cell disease. **Arch. Pathol. Lab. Med.**, n.129, p.760-5, 2005.
- YEGUTKIN, G. et al. Intravascular ADP and soluble nucleotidases contribute to acute prothrombotic state during vigorous exercise in humans. **J. Physiol.**, v.579, p.553–564, 2007.

- YEGUTKIN, G. Nucleotide and nucleoside converting ectoenzymes: important modulators of purinergic signalling cascade. **Biochim. Biophys. Acta**, v.1783, p.673-694, 2008.
- YEGUTKIN, G. et al. Metabolism of circulating ADP in the bloodstream is mediated via integrated actions of soluble adenylate kinase-1 and NTPDase1/CD39 activities. **FASEB J.**, v.16, 2012.
- YOUNG, J.D. et al. Purification and characterization of a cytolytic pore-forming protein from granules of cloned lymphocytes with natural killer activity. **Cell**, v.44, n.6, p.849-859, 1986.
- ZAGO, M.A.; FALCÃO, R.P.; PASQUINI, R. **Hematologia: Fundamentos e Prática**. São Paulo: Atheneu, 2004, 1081p.
- ZAVIALOV, A.V; ENGSTROM, A. Human ADA2 belongs to a new family of growth factors with adenosine deaminase activity. **Biochem. J.**, v. 391, p. 51-57, 2005.
- ZHANG Y. et al. Detrimental effects of adenosine signaling in sickle cell disease. **Nat. Med.**, v.17, p.79–86, 2011.
- ZENNADI, R.; CHIEN, A.; TELEN, M.J. Sickle red cells induce adhesion of lymphocytes and monocytes to endothelium. **Blood**, n.112, v.8, p.3474-3483, 2008.
- ZIMMERMANN, H. Nucleotides and CD39: principal modulatory players in haemostasis and thrombosis. **Nat. Med.**, n.5, p. 1010–1017, 1999.
- ZIMMERMANN, H. Extracellular metabolism of ATP and other nucleotides. **Sch. Pharmacol.**, v.362, p.299-309, 2000.
- ZIMMERMANN, H. Ectonucleotidases: Some recent developments and a note on nomenclature. **Drug Devel. Res.**, n.52, p.44-56, 2001.
- ZIMMERMANN, H.; MISHRA, S.K.; SHULA, V. Ecto-nucleotidase, molecular properties and functional impact. **Anales Real Acad. Nac. Farmacia**, v.73, p.537-566, 2007.
- ZIMMERMANN, H.; ZEBISCH, M.; STRATER, N. Cellular function and molecular structure of ecto-nucleotidases. **Purinergic Signal.**, v.8, n.3, p.437-502, 2012.
- ZHOU, Z. et al. Haemoglobin blocks vonWillebrand factor proteolysis by ADAMTS-13: a mechanism associated with sickle cell disease. **Thromb.s Haemost.**, v.101, n.6, p.1070–1077, 2009.
- ZHOU, Z.; BEHYMER, M.; GUCHHAIT, P. Role of Extracellular Hemoglobin in Thrombosis and Vascular Occlusion in Patients with Sickle Cell Anemia. **Anemia**, 2011.

## ANEXO

### ANEXO A – Parecer Consubstanciado do Comitê de Ética para Pesquisa com Seres Humanos.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE  
SANTA MARIA/ PRÓ-REITORIA  
DE PÓS-GRADUAÇÃO E



#### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

##### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** Avaliação da sinalização purinérgica em plaquetas e linfócitos de pacientes com anemia falciforme

**Pesquisador:** Daniela Bitencourt Rosa Leal

**Área Temática:**

**Versão:** 1

**CAAE:** 26154113.0.0000.5346

**Instituição Proponente:** Universidade Federal de Santa Maria/ Pró-Reitoria de Pós-Graduação e

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

##### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 512.074

**Data da Relatoria:** 14/01/2014

##### Apresentação do Projeto:

O projeto se intitula "Avaliação da sinalização purinérgica em plaquetas e linfócitos de pacientes com anemia falciforme" e se constitui projeto de tese do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da UFSM.

Na p. 3 consta que o pelo projeto se propõe a avaliar a sinalização purinérgica em plaquetas e linfócitos de pacientes com anemia falciforme. Está dito que "as hemoglobinopatias constituem uma das principais e mais frequentes doenças genéticas que acometem os seres humanos. A anemia falciforme (AF) é a forma mais prevalente e com maior gravidade clínica e hematológica, sendo geneticamente determinada pela homozigose da hemoglobina S. A anemia falciforme está associada a um estado inflamatório sistêmico e crônico, e a um fenótipo pró-adesivo e pró-coagulante sendo a maioria das mortes relacionada às oclusões vasculares. Os nucleotídeos extracelulares ATP, ADP e AMP e o nucleosídeo adenosina são importantes moléculas sinalizadoras que modulam as ações de plaquetas e linfócitos, sendo essenciais para o início e a manutenção das reações inflamatórias. Também atuam efetivamente na regulação da resposta vascular ao dano endotelial por exercerem diversos efeitos nas plaquetas. Os efeitos destas moléculas são promovidos através da ativação de receptores purinérgicos específicos, tais como o receptor P2X7,

**Endereço:** Av. Roraima, 1000 - Prédio da Reitoria, 2º andar  
**Bairro:** Cidade Universitária - Camobi **CEP:** 97.105-900  
**UF:** RS **Município:** SANTA MARIA  
**Telefone:** (55)3220-9362 **E-mail:** cep.ufsm@gmail.com

Continuação do Parecer: 512.074

cuja interação é dependente da atividade de um complexo enzimático, formado pelas enzimas E-NTPDase, E-NPP, E-5 $\zeta$ -nucleotidase e adenosina desaminase. Estas enzimas estão localizadas na superfície de plaquetas e linfócitos e desempenham um papel importante na manutenção da hemostasia normal, prevenindo a excessiva agregação plaquetária, e estando relacionadas à resposta inflamatória. Sendo assim, sabendo-se que a patologia da AF está associada a um aumento na adesividade celular e ao processo inflamatório, os quais desencadeiam processos vaso-oclusivos."

Na p. 13 consta a seguinte descrição para os critérios de inclusão e exclusão: "Serão incluídos na pesquisa indivíduos com AF, previamente diagnosticados e atendidos no Serviço de Hematologia e Oncologia do HUSM e do HCPA, de acordo com parâmetros clínicos e critérios laboratoriais. No grupo de pacientes com AF, serão excluídos do estudo indivíduos com AF que possuírem algum tipo de doença auto-imune ou outra imunodeficiência, pacientes com outro tipo de doença inflamatória crônica, diabéticos, fumantes e hipercolesterolêmicos conforme prévia avaliação clínica e laboratorial, registro de prontuário e entrevista [...]. Indivíduos com AF e que receberam transfusão de sangue pelo menos 2 meses antes da coleta também serão excluídos. O grupo controle será composto por indivíduos saudáveis, não fumantes, que não apresentam doenças auto-imunes, inflamatórias ou com alterações plaquetárias, o que será verificado através da realização de testes laboratoriais."

Os procedimentos previstos no âmbito do projeto envolvem: coleta dos dados clínicos e pessoais, coleta das amostras biológicas dos pacientes com AF, coleta das amostras do grupo controle, Armazenamento das amostras, Isolamento de plaquetas e linfócitos de sangue periférico, Determinação de proteína, determinação da atividade enzimática da E-NTPDase e E-5 $\zeta$ -nucleotidase em plaquetas e linfócitos, determinação da atividade da E-NPP em plaquetas e soro, determinação da atividade enzimática da E-ADA em plaquetas, linfócitos, eritrócitos e soro, determinação enzimática in vitro com a terapia utilizada contra AF, determinação da expressão de CD73 e CD39 em plaquetas e linfócitos por citometria de fluxo, determinação da expressão de P2X7 e CD39 em plaquetas e linfócitos por western blot, determinação da expressão do receptor P2X7 em linfócitos por PCR em tempo real, determinação da agregação plaquetária, determinação dos níveis séricos de citocinas por citometria de fluxo, determinação das concentrações de ATP, ADP, AMP e adenosina no soro.

Endereço: Av. Roraima, 1000 - Prédio da Reitoria 2º andar  
Bairro: Cidade Universitária - Camobi CEP: 97.105-900  
UF: RS Município: SANTA MARIA  
Telefone: (55)3220-9362 E-mail: cep.ufsm@gmail.com

Continuação do Parecer: 512.074

Na p. 19 consta que análise estatística dos dados será feita pelo "teste t. Os resultados serão considerados significantes quando  $P < 0,05$ ."

Consta do texto revisão bibliográfica inicial, cronograma e orçamento.

**Objetivo da Pesquisa:**

Na p. 11 consta que o objetivo geral é "avaliar a sinalização purinérgica em plaquetas e linfócitos de pacientes com anemia falciforme."

Os objetivos específicos são:

- avaliar a atividade da E-NTPDase em plaquetas e linfócitos;
- avaliar a atividade da E-NPP em plaquetas e soro;
- avaliar a atividade da E-5 $\zeta$ nucleotidase em plaquetas;
- avaliar a atividade da E-ADA em plaquetas, linfócitos, eritrócitos e soro;
- quantificar os nucleotídeos e nucleosídeo da adenina em soro;
- analisar o perfil de agregação plaquetária;
- verificar o efeito in vitro da hidroxiuréia e outros fármacos sobre a atividade das enzimas E-NTPDase, E-NPP, E-5 $\zeta$ nucleotidase e E-ADA em linfócitos e plaquetas;
- determinar a expressão de CD73 e CD39 em plaquetas e linfócitos;
- determinar a expressão do receptor purinérgico P2X7 em plaquetas e linfócitos;
- determinar os níveis séricos de citocinas referentes às respostas Th1, Th2 e Th17."

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Na p. 30 consta a seguinte descrição de riscos e benefícios:

"Procedimento e riscos: Na coleta de sangue haverá o risco de um pequeno desconforto devido à picada da agulha. O local da coleta poderá ficar dolorido ou arroxeadado, voltando ao normal em poucos dias, não causando problemas a sua saúde. Providências serão tomadas a fim de se evitar os riscos da coleta, portanto, se o local da coleta ficar arroxeadado, será realizado uma compressão no local durante pelo menos dois minutos e compressas frias serão utilizadas auxiliando na redução da dor. Ao responder ao questionário você poderá sentir um leve cansaço. Benefícios: Os resultados não irão trazer benefícios diretos, porém sua contribuição é importante. Para aprimorarmos nossos conhecimentos sobre a evolução e tratamento da doença. Ao participar

Endereço: Av. Roraima, 1000 - Prédio da Reitoria 2º andar  
Bairro: Cidade Universitária - Camobi CEP: 97.105-900  
UF: RS Município: SANTA MARIA  
Telefone: (55)3220-9362 E-mail: cep.utsm@gmail.com

UNIVERSIDADE FEDERAL DE  
SANTA MARIA/ PRÓ-REITORIA  
DE PÓS-GRADUAÇÃO E



Continuação do Parecer: 512.074

desta pesquisa o senhor não terá gasto ou lucro financeiro e não será feito qualquer tipo de pagamento pela sua participação na pesquisa."

Entende-se que essa descrição é suficiente.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

-

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Termo de confidencialidade: foi apresentado de modo suficiente.

TCLE: foi apresentado de modo suficiente.

Autorização institucional: foi apresentada de modo suficiente.

**Recomendações:**

-

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

-

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

**Considerações Finais a critério do CEP:**

Endereço: Av. Roraima, 1000 - Prédio da Reitoria 2º andar  
Bairro: Cidade Universitária - Camobi CEP: 97.105-900  
UF: RS Município: SANTA MARIA  
Telefone: (55)3220-9362 E-mail: cep.ufsm@gmail.com

UNIVERSIDADE FEDERAL DE  
SANTA MARIA/ PRÓ-REITORIA  
DE PÓS-GRADUAÇÃO E



Continuação do Parecer: 512.074

SANTA MARIA, 19 de Janeiro de 2014

---

Assinador por:  
Félix Alexandre Antunes Soares  
(Coordenador)

Endereço: Av. Roraima, 1000 - Prédio da Reitoria 2º andar  
Bairro: Cidade Universitária - Camobi CEP: 97.105-900  
UF: RS Município: SANTA MARIA  
Telefone: (55)3220-9362 E-mail: cep.ufsm@gmail.com

Página 05 de 05