



## Efeitos de moléculas inflamatórias nos dados hematológicos de um modelo animal de anemia falciforme

**Autores:** Yasmin Oliveira De Colo, Dienifer Da Costa Oliveira, Pamela Lara Brito, Fernanda C. Z. Fabris, Nicola Conran, Lidiane Torres

**Palavras chaves:** Anemia falciforme; Fator de transformação do crescimento beta (TGF- $\beta$ ); Hemoglobina; Leucócitos; Vasos sanguíneos

**Introdução:** A anemia falciforme é uma doença hereditária na qual as hemácias apresentam o formato de foice, o que dificulta sua passagem nos vasos sanguíneos e contribui para as crises de vaso-oclusão e os processos inflamatórios. O Fator Transformante do Crescimento (TGF-  $\beta$ ) é uma citocina com múltiplos efeitos. O TGF-  $\beta$  é elevado no sangue de pacientes com anemia falciforme e acreditamos que essa citocina pode exercer efeitos anti-inflamatórios nesses pacientes, diminuindo assim os processos vaso-oclusivos.

**Objetivo:** O objeto deste estudo foi avaliar os efeitos da administração da citocina TGF- $\beta$ , ou um anticorpo que inibe os seus efeitos (anti-TGF- $\beta$ ), nos parâmetros hematológicos de camundongos com anemia falciforme.

**Metodologia:** Foram utilizados camundongos quiméricos C57Bl/6 (machos, n=10) como controles e camundongos quiméricos Berkeley (machos, n=12), que correspondem a um modelo alterado geneticamente que expressa apenas globina  $\alpha$  e  $\beta$ S humana. Este animal apresenta as mesmas características genéticas, hematológicas e fisiopatológicas dos seres humanos com anemia falciforme. Animais entre 5-6 meses de idade foram tratados por 3 dias seguidos com uma dose diária de salina (200 $\mu$ L; i.p), TGF- $\beta$ 1(2 $\mu$ g;200 $\mu$ L; i.p), ou anti-TGF $\beta$  (100 $\mu$ g; 200 $\mu$ L; i.p). O experimento foi realizado no quarto dia. Alguns animais receberam também, um estímulo inflamatório utilizando a fator de Necrose Tumoral Alfa (TNF $\alpha$ ) (0,5 $\mu$ g;200 $\mu$ L;i.p) três horas antes do experimento. Na hora do experimento,



coletamos 100  $\mu$ l de sangue do animal. O hemograma e análise das amostras foram realizados utilizando o equipamento Act Diff Counter (Beckman Coulter) e o software GaphPad Prism 6.0.

**Resultados:** Comparando os parâmetros hematológicos dos camundongos C57Bl/6 (CON) com os dos camundongos quiméricos Berkeley com doença falciforme (DF) (Figura 1), não observamos diferenças em relação aos números de leucócitos (Figura 1A), mas observamos diminuições na contagem de hemácias (Figura 1B), quantidade de hemoglobina no sangue (Figura 1C) e número de plaquetas (Figura 1D).

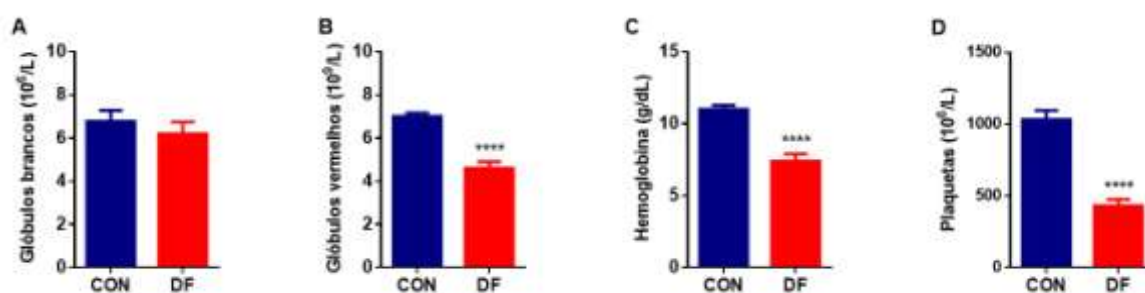
Quando tratamos os camundongos CON e DF com a citocina pro-inflamatória TNF $\alpha$ , de maneira geral, observamos uma diminuição no número de leucócitos circulantes, em comparação com animais que receberam salina (Figura 2A). O TNF- $\alpha$  é uma citocina pró-inflamatória; quando aplicado nos animais anêmicos ela vai agir estimulando uma inflamação, ocasionando assim a ativação das células. Não houve diferença nos números de hemácias nos animais (Figura 2B) e nem na hemoglobina (Figura 2C) após administração de TNF $\alpha$ . Por outro lado o TNF $\alpha$  diminuiu o número de plaquetas nos animais CONT e DF (Figura 2D). As diminuições nos números circulantes de leucócitos e plaquetas nos animais se devem aos processos inflamatórios que resultam na adesão e agregação destas células no vaso sanguíneo.

Quando administramos uma molécula que bloqueia a função da TGF- $\beta$  (anti- TGF- $\beta$ ) nos animais, antes do estímulo inflamatório, não observamos diferença nos parâmetros hematológicos (Figura 3A-D). Como não houve nenhuma alteração, isso significa que o bloqueio do TGF- $\beta$  não interfere nesses índices. No entanto, a administração da citocina TGF- $\beta$  aumentou os números de glóbulos brancos nos animais controles com TNF- $\alpha$ . Como o TNF- $\alpha$  aumenta a inflamação, acreditamos que o TGF- $\beta$ 1 tenha diminuído a quantidade de leucócitos aderidos no vaso sanguíneo e aumentado a quantidade na circulação (Figura 3E). De forma surpreendente, nos animais DF, a administração de TGF- $\beta$  aumentou o número de hemácias e a concentração de hemoglobina no sangue (Figura 3F-G). É provável que as

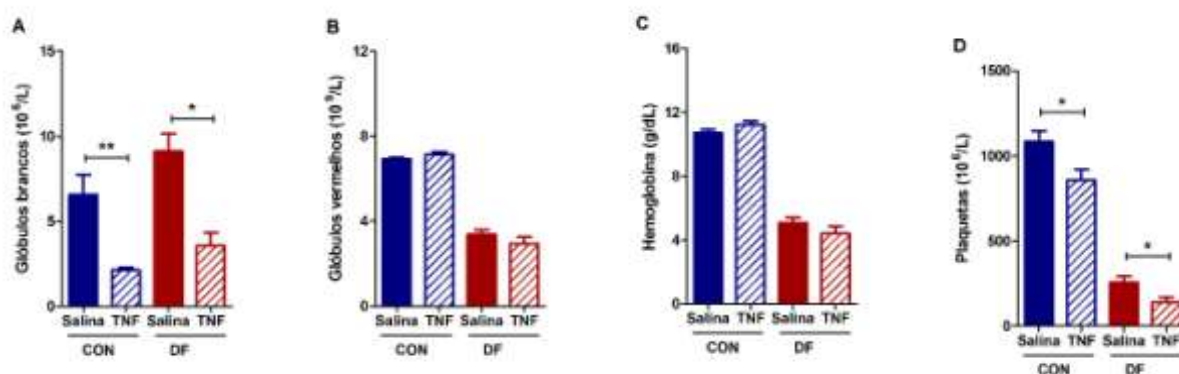


complicações que levam os camundongos a ter hemólise (destruição dos glóbulos vermelhos) diminuem após administração de TGF- $\beta$ . O aumento significativo das plaquetas (Figura 3H) nos camundongos DF está associado à diminuição da inflamação.

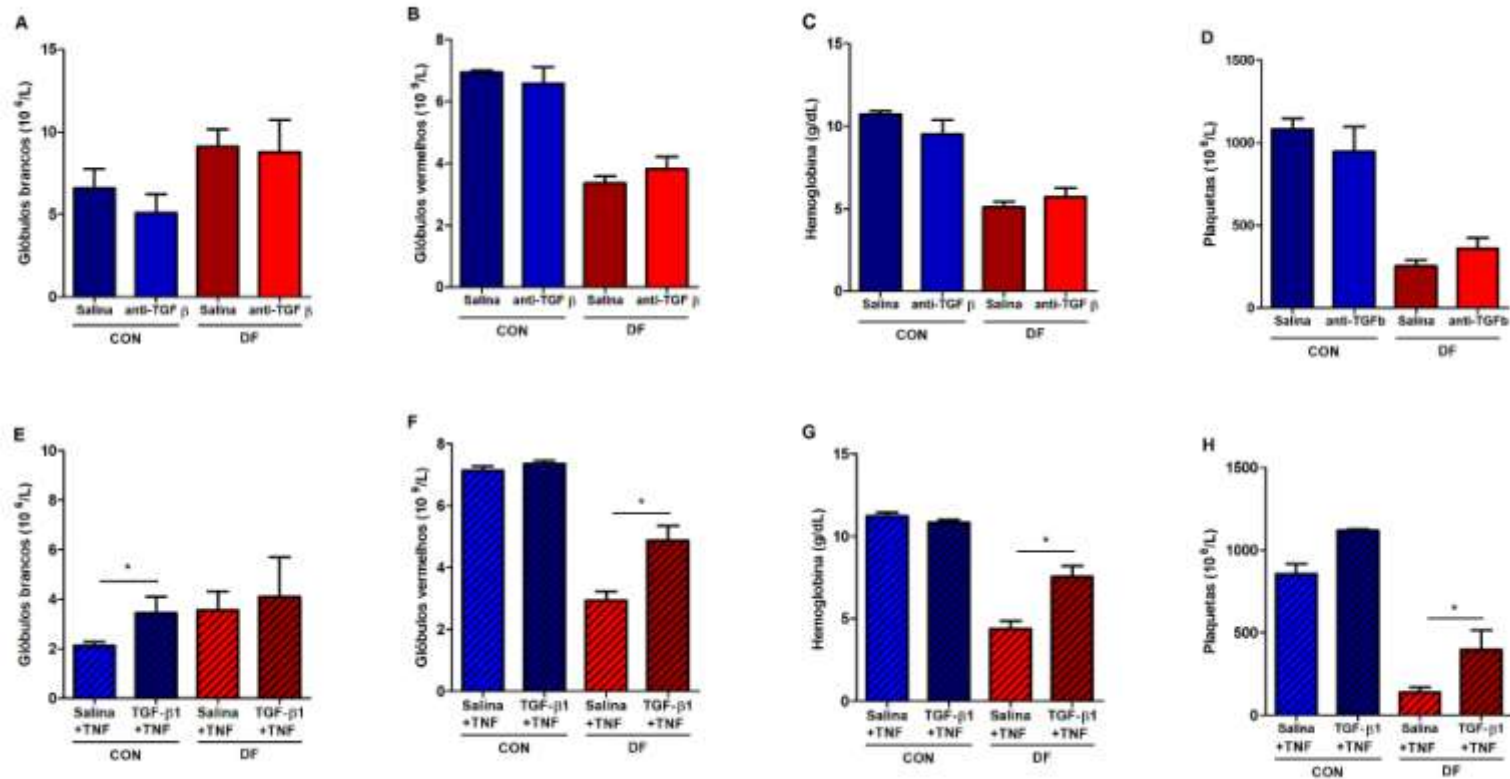
**Conclusão:** Com os resultados obtidos observamos que o TGF- $\beta$ 1 é capaz de diminuir a inflamação, atuando nos leucócitos e plaquetas, fazendo com que as células e as plaquetas se tornem menos ativadas e aderentes, possivelmente diminuindo assim as complicações e processos vaso-oclusivos nesses camundongos com anemia falciforme.



**Figura 1.** Comparação dos dados hematológicos entre animais controles C57BL/6 (CON, N=10) e animais Berkeley com doença falciforme (DF, N=12). (A) Glóbulos brancos ( $10^6/\mu\text{L}$ ). (B) Glóbulos vermelhos ( $10^9/\mu\text{L}$ ). (C) Hemoglobina (g/dL). (D) Plaquetas ( $10^6/\mu\text{L}$ ). Student's t-test; \*\*\*\* $p < 0.0001$ .



**Figura 2.** Dados hematológicos de animais controles (CON, N=7-9) e com doença falciforme (DF, N=5-7) após indução da inflamação com TNF- $\alpha$ . (A) Glóbulos brancos ( $10^6/\mu\text{L}$ ). (B) Glóbulos vermelhos ( $10^9/\mu\text{L}$ ). (C) Hemoglobina (g/dL). (D) Plaquetas ( $10^6/\mu\text{L}$ ). Student's t-test; \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ .



**Figura 3.** Efeito do bloqueio de TGF- $\beta$  (anti-TGF- $\beta$ ; A-D) e da administração de TGF- $\beta$  (E-H) no hemograma de camundongos controles (CON, N=2-7) e com doença falciforme (DF, N=2-5). (A, E) Glóbulos brancos ( $10^6/\mu\text{L}$ ). (B, F) Glóbulos vermelhos ( $10^9/\mu\text{L}$ ). (C, G) Hemoglobina (g/dL). (D, H) Plaquetas ( $10^6/\mu\text{L}$ ). Student's t-test; \* $p < 0.05$ .