



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE MEDICINA
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ – FIOCRUZ
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ**



FIOCRUZ

Curso de Pós-graduação em Patologia Humana

TESE DE DOUTORADO

**METABOLISMO DA ARGININA E MOLÉCULAS
ASSOCIADAS À ATIVAÇÃO ENDOTELIAL NA ANEMIA
FALCIFORME**

Wendell Vilas Boas Santos

Salvador - Bahia - Brasil

2011



UFBA

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE MEDICINA
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ – FIOCRUZ
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ**



FIOCRUZ

Curso de Pós-graduação em Patologia Humana

**METABOLISMO DA ARGININA E MOLÉCULAS
ASSOCIADAS À ATIVAÇÃO ENDOTELIAL NA ANEMIA
FALCIFORME**

Wendell Vilas Boas Santos

Orientadora: Dra. Marilda de Souza Gonçalves

Tese apresentada ao Colegiado do Curso de Pós-graduação em Patologia Humana, como pré-requisito obrigatório para obtenção do grau de Doutor.

Salvador - Bahia - Brasil

2011

Ficha Catalográfica elaborada pela Biblioteca do
Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz / FIOCRUZ - Salvador - Bahia.

Santos, Wendell Vilas Boas
S237m Metabolismo da arginina e moléculas associadas à ativação endotelial na
anemia falciforme [manuscrito]. / Wendell Vilas Boas Santos. - 2011.
81 f. : il. ; 30 cm.

Datilografado (fotocópia).

Tese (doutorado) – Universidade Federal da Bahia. Centro de Pesquisas
Gonçalo Moniz, 2011.

Orientadora: Prof. Dra. Marilda de Souza Gonçalves, Laboratório de
Patologia e Biologia Molecular.

1. Anemia Falciforme. 2. Arginase. 3. Homocisteína. 4. Citocinas. I. Título.

CDU 616.155.194

À toda minha família,

por todo o amor a mim dispensado e

por estarem sempre presentes na minha vida.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida, saúde, coragem e todas as coisas boas na minha vida;

A Profa. Marilda, pela excelente orientação, aconselhamento, incentivo, exemplo de ética e profissionalismo, por toda ajuda nas questões pessoais e de trabalho e pelo senso de humor que sempre nos proporciona momentos agradáveis;

Aos Membros da Banca Examinadora, pelas contribuições que certamente são essenciais para este trabalho;

A Bruno Cerqueira, pelo companheirismo e amizade em todo este tempo de Doutorado e pela ajuda crucial em todas as fases desta tese;

Aos membros da equipe e amigos que sempre estiveram por perto pra qualquer auxílio que eu necessitasse, por todo incentivo e torcida;

Aos Amigos que são parte da minha história, por estarem presentes em todos os momentos da minha vida e fazerem parte dela;

Aos amigos do LPBM, por fazerem parte do meio ambiente do trabalho sempre contribuindo para meu crescimento;

Aos Pacientes que aceitaram participar deste trabalho, pois sem eles não seria possível sua realização;

Ao HEMOBA e ao seu corpo médico, pela facilitação do acesso aos pacientes;

A Elze Leite e Cleiton Carneiro pelo apoio logístico;

A toda equipe da Biblioteca, local onde passei boa parte do meu tempo, pelos serviços e cordialidade prestados;

A todos os membros da Pós graduação pela ajuda nas questões burocráticas referentes ao Doutorado;

Ao CPqGM / FIOCRUZ, pela estrutura física e pessoal que proporcionaram a realização deste trabalho;

Ao CNPq pela ajuda financeira em todo esse período de doutorado.

SUMÁRIO

Resumo

Abstract

Lista de Abreviaturas

1. Introdução.....	11
2. Justificativa	27
3. Objetivos	30
4. Lista dos Artigos	32
Artigo 1	33
Artigo 2	40
Artigo 3	58
5. Discussão.....	63
6. Conclusões.....	73
7. Referências Bibliográficas	75
8. Apêndices – Artigos	81

RESUMO

METABOLISMO DA ARGININA E MOLÉCULAS ASSOCIADAS À ATIVAÇÃO ENDOTELIAL NA ANEMIA FALCIFORME. A anemia falciforme (AF) é uma doença genética com prevalência mundial elevada, sendo considerada uma doença multisistêmica, uma vez que é caracterizada por manifestações clínicas agudas e crônicas e pelo comprometimento progressivo de órgãos e sistemas. A AF é caracterizada por uma disfunção endotelial acentuada que pode ser decorrente de vários fatores. Os distúrbios no metabolismo da arginina estão relacionados ao estado inflamatório crônico apresentado pelos pacientes com AF e a homocisteína (Hcy) pode também estar relacionada, cujo aumento plasmático está associado a ativação endotelial e o estado inflamatório em diferentes patologias. Estão inclusos nesta tese o conjunto de três manuscritos com o objetivo de investigar moléculas associadas à ativação endotelial em pacientes com AF, com ênfase para as moléculas envolvidas no metabolismo do óxido nítrico (NO), como a arginase; Hcy, citocinas Th17, moléculas de adesão solúveis (sVCAM-1 e sICAM-1) e marcadores hemolíticos. Foram estudados indivíduos com AF em estado estável. Nossos resultados mostraram que a arginase plasmática e a citocina IL-17 estão elevadas em pacientes com AF. Além disso, a citocina TGF-beta está positivamente associada a arginase nos mesmos pacientes. A Hcy foi associada com a ativação endotelial, uma vez que a Hcy esteve correlacionada positivamente com sVCAM e as citocinas IL-17 e TGF-beta. Os níveis diminuídos da citocina IL-18 foram relacionados a ocorrência de seqüestro esplênico. O papel de novos marcadores de inflamação vascular pode ajudar no entendimento da complexidade da fisiopatologia da AF, principalmente o relacionado ao metabolismo da arginina e NO, moléculas cruciais na manutenção vascular. Nossos dados mostram alvos importantes, como a arginase, Hcy e a IL17, que podem ser explorados como fatores adicionais na inflamação, ativação endotelial e vaso-occlusão na AF.

Palavras chaves: 1. Anemia Falciforme; 2. Arginase; 3. Homocisteína; 4. Citocinas Th17

ABSTRACT

ARGININE METABOLISM AND MOLECULES ASSOCIATED TO ENDOTHELIAL ACTIVATION IN SICKLE CELL DISEASE. Sickle-cell disease is one of the most common severe monogenic disorders worldwide. It is considered a multisystem disease, associated with episodes of acute illness and progressive organ damage. Sickle Cell Anemia (SCA) is characterized by a marked endothelial dysfunction, owing to many factors. Dysregulated arginine metabolism can be related to the inflammatory chronic state presented by patients and homocysteine (Hcy) can be also related to inflammatory state, once its increase serum levels can enhance the endothelial activation and inflammation state in several pathologies. It was included in this thesis a set of three manuscripts that aim to investigate molecules implicated in the endothelial activation in SCA patients, emphasizing molecules involved on Nitric Oxide (NO) metabolism, such as arginase, Hcy, Th17, cytokines, soluble adhesion molecules (sVCAM-1 e sICAM-1) and hemolytic markers. We studied sickle cell anemia patients in steady state. Our results showed a rising arginase levels and IL-17 cytokine in the SCA patients. Moreover, the cytokine TGF-beta is associated with higher arginase levels in the same sickle cell patients. The Hcy was related to endothelial activation, since the Hcy was positively associated with sVCAM, IL-17 and TGF-beta. Patients who had a splenic sequestration event had low IL-18 levels. The role of novel inflammation markers can help to understand the complexity of pathophysiology in the SCA, mainly related to arginine and NO metabolism that is essential to vascular maintenance. Our data show important targets, such as arginase, Hcy and IL-17, that can be explored as an additional risk factor to endothelial inflammation and activation and vaso-occlusion in SCD.

Key Words: 1.Sickle cell disease; 2.Arginase; 3.Homocysteine; 4.Th17 cytokines

Lista de Abreviaturas

ADP	Adenina Difosfato
AF	Anemia Falciforme
APAE	Associação de Pais e Amigos dos Excepcionais
AVC	Acidente Vascular Cerebral
cAMP	Adenina Monofosfato Cíclico
cGMP	Guanosina Monofostato Cíclico
DF	Doença Falciforme
eNOS	Óxido Nítrico Sintase Endotelial
ESL-1	Ligante de E-selectina-1
ET-1	Endotelina-1
GTP	Guanosina Trifosfato
Hb	Hemoglobina
Hcy	Homocisteína
ICAM-1	Molécula de Adesão Intercelular
IL-17	Interleucina 17
LDH	Lactato Desidrogenase
LDL	Lipoproteína de Baixa Densidade
LFA-1	Antígeno-1 Associado à Função Leucocitária
LPS	Lipopolissacarídeo Bacteriano
Mac-1	Antígeno-1 de Macrófago
MCP-1	Proteína Químioatraente de Monócitos
MHC	Complexo Principal de Histocompatibilidade
NO	Óxido Nítrico

NOS	Óxido Nítrico Sintase
PS	Fosfatidil Serina
ROS	Espécies Reativas de Oxigênio
STA	Síndrome Torácica Aguda
AST	Aspartato Aminotransferase
ALT	Alanina Aminotransferase
Th-17	Células T Auxiliares (Helper) 17
VCAM-1	Molécula de Adesão Celular Vascular
VLA-4	Antígeno de Ativação Tardio-4

1. INTRODUÇÃO

1- INTRODUÇÃO

A anemia falciforme (AF) é uma doença genética, com herança autossômica recessiva, decorrente da homozigose da hemoglobina variante S (HbS), que é caracterizada pela mutação pontual $GAG > GTG$ no sexto códon do gene *beta*, com substituição do ácido glutâmico por valina na sexta posição da cadeia polipeptídica beta (BUNN, 1997).

O termo doença falciforme (DF) é usado para diferentes genótipos que apresentam a HbS com significância clínica, incluindo a AF, que é a forma mais grave da doença (REES *et al.*, 2010).

A síntese de cadeias polipeptídicas beta S favorece a ocorrência de um *motif* hidrofóbico na molécula de hemoglobina (Hb), com formação de um tetrâmero desoxigenado que resulta na ligação entre as cadeias beta-1 e beta-2 de duas moléculas de Hb, com a organização de polímeros longos formados por filamentos duplos que se associam em feixes. Esses feixes de “cristais” dentro das hemácias podem ser vistos à microscopia eletrônica e causam deformações importantes no eritrócito, além do efluxo de potássio; aumento do cálcio intracelular; formação de polímeros de Hb com proteínas da membrana, em especial da banda 3, com alteração da arquitetura e flexibilidade, favorecendo a desidratação dos eritrócitos; exposição de moléculas na membrana celular, como a fosfatidil serina (PS) e o CD36, um receptor glicoprotéico que se liga a proteínas da matriz extracelular, facilitando a ligação da célula com o endotélio (BRITTENHAM *et al.*, 1985; ZAGO e PINTO, 2007).

A distribuição mundial da HbS decorre da combinação de dois fatores, a seleção de portadores do alelo mutante pela vantagem evolutiva em regiões em que a malária é endêmica e imigração de africanos devido ao tráfico de escravos. A presença do alelo mutante varia entre 0-15% na população africana, sendo que a região central da África

Subsaariana apresenta prevalência acima de 15%. Na Europa e na América do Norte a prevalência do alelo mutante varia de 0-3% (REES *et al.*, 2010).

O estado da Bahia apresenta frequência elevada de portadores da HbS, que variam entre sete a 14% (AZEVEDO *et al.*, 1981). Atualmente, com os dados da triagem neonatal realizada pela Associação de Pais e Amigos dos Excepcionais (APAE) sabe-se que ocorre o nascimento de uma criança a cada 600 com DF, sendo a Bahia o estado que apresenta a prevalência mais elevada do Brasil (SILVA *et al.*, 2006).

1.1. ASPECTOS CLÍNICOS NA AF

Apesar dos pacientes com DF terem em comum a presença da HbS, a clínica é bastante heterogênea, mesmo em indivíduos que apresentam o mesmo genótipo. Os indivíduos com AF possuem sintomas e complicações clínicas que podem variar de leves a graves. Os episódios de dores agudas causados por crises vaso-oclusivas são as causas comuns de hospitalização, sendo que a frequência destes episódios está associada ao prognóstico do paciente, incluindo a ocorrência de óbito precoce (PLATT *et al.*, 1991; REES *et al.*, 2010). As infecções bacterianas são as maiores causas de morbidade e mortalidade em crianças com AF, que apresentam susceptibilidade elevada a diferentes agentes patogênicos, tais como *Streptococcus pneumoniae* e *Haemophilus influenzae*, em decorrência do comprometimento da função esplênica. Outros fatores estão também associados ao prognóstico clínico da doença, envolvendo a deficiência de micronutrientes, defeitos na ativação do complemento e isquemia tecidual (REES *et al.*, 2010).

A Síndrome Torácica Aguda (STA) é uma causa importante de mortalidade na AF, além de ser a segunda maior causa de hospitalização. É caracterizada por um dano pulmonar agudo com infiltrado alveolar (GLADWIN & VICHINSKY, 2008). A AF é uma das maiores

causas de Acidente Vascular Cerebral (AVC) em crianças, sendo a maioria dos casos relacionados à vasculopatias que afetam as carótidas internas e artérias cerebrais (STUART & NAGEL, 2004). Outras complicações clínicas incluem a hipertensão pulmonar, priapismo, colelitíase, retinopatias, disfunção cardíaca, insuficiência renal, úlceras maleolares e necroses ósseas (STUART & NAGEL, 2004).

Sabe-se que a mutação que causa a AF, por si só, não é suficiente para explicar todas as características graves da doença, sendo extensa a gama de expressões fenotípicas até mesmo em pacientes com genótipo idêntico de Hb (ALEXANDER *et al.*, 2004). Essa heterogeneidade clínica tem sido atribuída a fatores ambientais, psicossociais e genéticos, como por exemplo, a expressão de Hb fetal, presença de alfa-talassemia e dos haplótipos ligados aos genes da globina beta, aos quais tem sido atribuído a modulação da polimerização da HbS (NEBOR *et al.*, 2010).

1.2. HEMÓLISE

Um dos processos fisiopatológicos de importância na AF é a anemia hemolítica decorrente do encurtamento da vida média do eritrócito pela polimerização da HbS (KATO *et al.*, 2007). A hemólise varia em intensidade entre os genótipos diferentes da DF, sendo mais acentuada na AF.

Os biomarcadores de hemólise são importantes na avaliação do paciente com AF. A lactato desidrogenase (LDH) é um marcador de hemólise intravascular, e sua elevação plasmática está associada ao subfenótipo clínico de hipertensão pulmonar, priapismo e úlcera nos pacientes com AF (KATO *et al.*, 2006b). As concentrações das enzimas hepáticas aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT) e dos níveis de bilirrubina, principalmente a indireta, estão alteradas na hemólise (ROTHER *et al.*, 2005).

Dados de estudos epidemiológicos sugerem que diversas complicações da AF estão associadas ao aumento das taxas de hemólise, tais como colelitíase, úlceras de perna, priapismo e hipertensão pulmonar, que estão também associadas a concentrações diminuídas de Hb e elevação da hemólise intravascular (KATO *et al.*, 2007). Os produtos gerados em decorrência da hemólise intravascular são extremamente oxidativos, sendo que o grupamento heme e o ferro induzem o estresse oxidativo com geração de espécies reativas de oxigênio (ROS); em decorrência disso, algumas vias protetoras estão envolvidas, tais como a haptoglobina que se liga à hemoglobina livre prevenindo a sua eliminação direta pelos rins e que carrega os dímeros de globina para os macrófagos do sistema fagocítico mononuclear encarregado da remoção desses produtos por endocitose, via receptor CD163 (SCHAER *et al.*, 2007).

A hemólise é a causa principal do quadro de anemia e fadiga apresentado pelos pacientes com AF e, além disso, está também associada ao desenvolvimento de vasculopatias, que aumentam progressivamente com o passar do tempo e são caracterizadas pela hipertensão pulmonar, alterações na proliferação do endotélio e músculo liso dos vasos sanguíneos e disfunção endotelial (GLADWIN *et al.*, 2004; KATO *et al.*, 2006a). Desta forma, os pacientes que exibem concentrações diminuídas de Hb e taxas elevadas de hemólise parecem apresentar o subfenótipo que associa aos pacientes a probabilidade maior ao desenvolvimento de vasculopatias que aqueles com concentrações maiores de Hb, além de apresentarem número maior de episódios de dores agudas e, possivelmente, episódios de STA (KATO *et al.*, 2007).

A AF se caracteriza por apresentar estado inflamatório crônico, sendo que a gênese de grande parte das manifestações clínicas nessas doenças deve-se a três mecanismos inter-relacionados: a) adesão de eritrócitos, granulócitos, monócitos e plaquetas ao endotélio vascular; b) fenômenos inflamatórios crônicos, exacerbados por episódios agudos; c)

produção de intermediários inflamatórios, como citocinas e alterações do metabolismo do óxido nítrico (NO) (ZAGO & PINTO, 2007).

1.3. O PROCESSO VASO-OCCLUSIVO

O processo vaso-oclusivo na AF é caracterizado pela oclusão de microvasos em determinados sítios, causando episódios de dor e lesão tecidual, acompanhado por inflamação local (STUART & NAGEL, 2004). As hemácias de indivíduos com AF e, principalmente, os reticulócitos, expressam receptores de superfície, incluindo moléculas de adesão, como a integrina $\alpha_4\beta_1$, receptores para a família das imunoglobulinas e o CD36. A expressão aberrante dessas moléculas induz ao aumento na aderência das hemácias ao endotélio vascular (FRENETTE & ATWEH, 2007). A presença de leucócitos aderentes nos microvasos é também um fator chave que contribui para o processo de vaso-oclusão na AF, participando tanto na adesão ao endotélio quanto na liberação de citocinas e radicais livres (TURHAN *et al.*, 2002). Além disso, as hemácias falciformes podem interagir diretamente com os leucócitos, formando agregados heterocelulares, levando a uma redução do fluxo sanguíneo, hipóxia, formação de polímeros de HbS e propagação da oclusão para a vasculatura adjacente (TURHAN *et al.*, 2002).

As plaquetas também podem contribuir para a vaso-oclusão pela liberação, quando ativadas, da molécula solúvel CD40L que aumenta a inflamação endotelial e expressão de ligantes para os eritrócitos na superfície endotelial, resultando no ciclo de adesão do eritrócito – ativação de plaquetas – adesão do eritrócito (BENNETT, 2006). A figura 1 resume os eventos envolvidos no processo de vaso-oclusão.

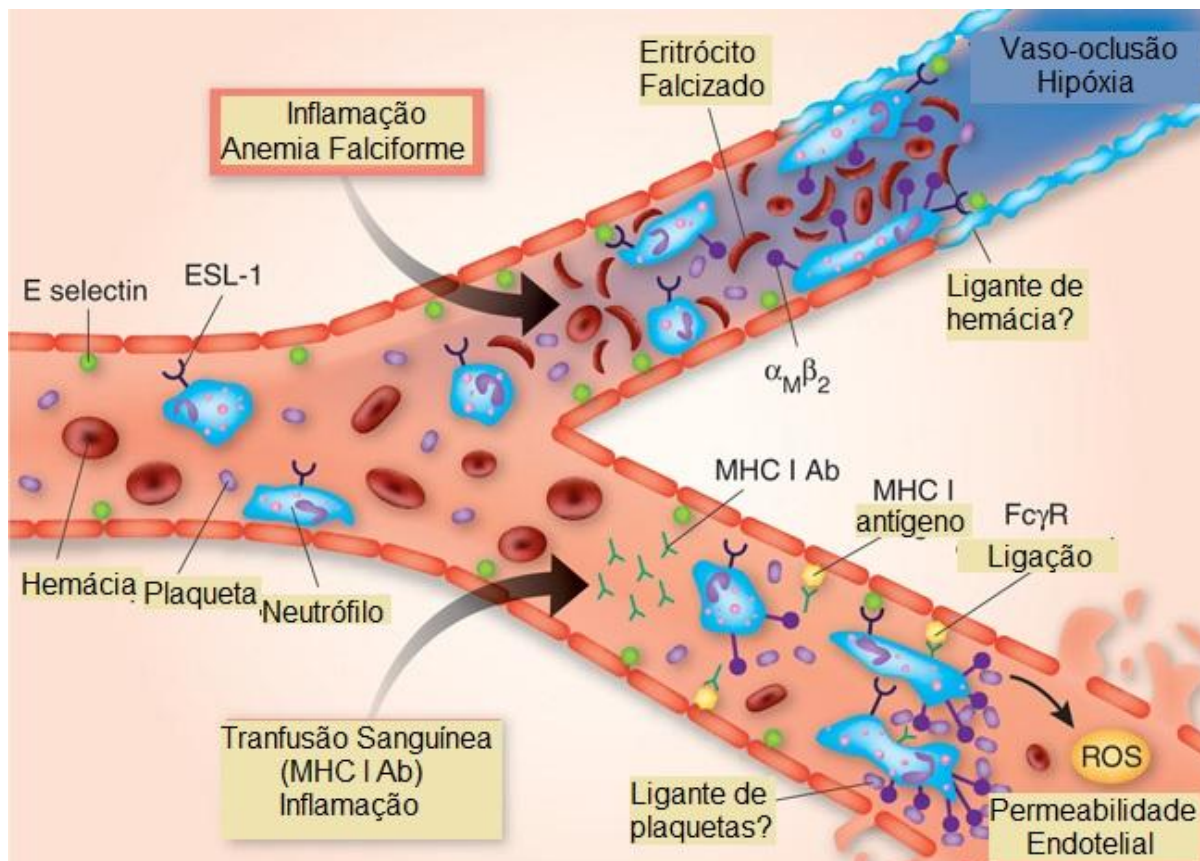


Figura 1. Representação dos principais eventos fisiopatológicos presentes no desenvolvimento da vaso-oclusão (adaptado de SEGEL *et al.*, 2010). O processo de vaso-oclusão compreende um evento complexo na qual estão envolvidos eritrócitos, reticulócitos, plaquetas, leucócitos e a adesão ao endotélio vascular, assim como o envolvimento de proteínas plasmáticas e fatores inflamatórios, como a expressão de citocinas pró-inflamatórias, levando a oclusão vascular e hipóxia.

A monocamada de células endoteliais protege todo o sistema vascular, sendo que a estrutura e função dessas células são imperativas para a manutenção da parede do vaso e da função circulatória. No entanto, além de funcionar como barreira, as células endoteliais participam da hemostase sanguínea, onde regulam processos de trombose e aderência de plaquetas (GALLEY & WEBSTER, 2004). O endotélio controla o tônus vascular e o fluxo sanguíneo pela produção de NO, endotelina e prostaglandinas. Ademais, essas células participam do processo de aterogênese e nas respostas anti e pro-inflamatórias devido a sua

habilidade de produzir e detectar citocinas e a expressão de moléculas de adesão sob certas circunstâncias (HARTGE *et al.*, 2007). Devido aos inúmeros mecanismos onde participam as células endoteliais, a disfunção, dano e ativação endotelial podem participar de inúmeras patologias incluindo a AF. Desta forma, as interações endoteliais desempenham papel fundamental em praticamente todos os mecanismos que participam do processo de vaso-oclusão e muito da fisiopatologia dessa doença (CONRAN & COSTA, 2009).

Os leucócitos, eritrócitos e plaquetas contribuem para o processo vaso-oclusivo que ocorre na microcirculação pela adesão celular ao endotélio vascular e contato célula-célula, causando uma barreira física para o fluxo sanguíneo, contribuindo para o estímulo inflamatório crônico, sendo que as moléculas de adesão celular e o endotélio são elementos chaves nesses mecanismos. Os ligantes endoteliais mais comuns na AF certamente estão relacionados às moléculas de adesão intercelular (ICAM-1) e a molécula de adesão da célula vascular (VCAM-1) (MORRIS *et al.*, 2005).

A ICAM-1 é uma molécula de adesão, semelhante à imunoglobulina, que se liga à integrina *Lymphocyte function-associated antigen 1* (LFA-1) que é encontrada em todas as células T e também em células B, macrófagos e neutrófilos e que está envolvida no recrutamento celular para os sítios de infecção. O LFA-1 é parte da família de integrina dos leucócitos que são reconhecidas pelas cadeias comuns beta (CD18) e pela cadeia distinta alfa (CD11a) (ALON *et al.*, 1995).

A importância da ICAM-1 na adesão leucócito-endotélio é comprovada pelo fato de estudos experimentais de transfecção desta molécula mostrarem que a ICAM por si só, é suficiente na reconstituição da transmigração de células que carece de outros receptores de adesão (SANS *et al.*, 2001). A VCAM-1 interage com o seu ligante maior, que é o *Very Late Antigen-4* (VLA-4), para mediar a adesão celular e migração transendotelial de leucócitos (WAUTIER & WAUTIER, 2011). As moléculas de adesão desempenham papel fisiológico

vital no recrutamento e adesão das células ao endotélio vascular. As E-selectinas e P-selectinas proporcionam a rolagem de leucócitos específicos pela superfície endotelial até o momento da adesão firme por meio da VCAM-1 e ICAM-1 ligados à superfície celular (ALON & FEIGELSON, 2002). Os leucócitos dos indivíduos com AF parecem estar em estado ativado com aumento na expressão e na atividade da integrina *Macrophage-Antigen* (Mac-1) ou *integrin alphaMbeta2* (composto pelo CD11b e CD18) demonstrando alterações significantes na adesão às proteínas subendoteliais, à camada de células endoteliais e proteínas endoteliais (BENKERROU *et al.*, 2002; ASSIS *et al.*, 2005).

Durante o processo inflamatório, a adesão de plaquetas às paredes dos vasos sanguíneos está aumentada. Em indivíduos saudáveis, o endotélio não ativado, geralmente, inibe a adesão das plaquetas pela produção de fatores antitrombóticos, particularmente o NO. No entanto, nos vasos submetidos ao processo inflamatório, o endotélio ativado pode estimular a adesão de plaquetas devido a liberação do difosfato de adenosina (ADP), do fator tecidual (CD142) e fator de Von Willebrand, uma glicoproteína multimérica com função na hemostasia primária, que forma pontes entre glicoproteínas plaquetárias e estruturas do endotélio vascular (VAN GILS *et al.*, 2009). As plaquetas na AF também demonstram propriedades adesivas elevadas, com afinidade aumentada da integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$, ligante de plaquetas, ao fibrinogênio em ensaio de adesão *in vitro*, o que significa que as plaquetas provavelmente têm afinidade maior na adesão nas paredes dos vasos na AF durante a agressão endotelial (FERREIRA *et al.*, 2008).

1.4. O ÓXIDO NÍTRICO

O NO é uma molécula de gás diatômica solúvel, com elétron desemparelhado, o que o torna um radical livre com propriedades de reações biológicas únicas (WINK & MITCHELL, 1998). O NO é produzido no endotélio vascular pela enzima endotelial óxido nítrico sintase (eNOS), pela conversão oxigênio-dependente de arginina para citrulina (PALMER *et al.*, 1987).

Uma vez produzido, o NO pode se difundir de forma parácrina para o músculo liso adjacente, onde se liga avidamente à enzima solúvel guanilato sintase. Essa ativação da enzima converte guanosina trifosfato (GTP) à guanosina monofostato cíclico (cGMP) e ativa as proteínas kinases dependentes de cGMP, que agem no sequestro do cálcio celular, produz relaxamento muscular e conseqüentemente a vasodilatação (IGNARRO *et al.*, 1987).

Além de favorecer a vasodilatação, que controla aproximadamente 25% do nosso fluxo sanguíneo, o NO promove a homeostase geral e também reage com o grupamento heme da Hb, com taxas limitadas de difusão, produzindo metahemoglobina e nitrato e nitrosil-hemoglobina (OLSON *et al.*, 2004). Devido à velocidade dessas reações e sua irreversibilidade, seria lógico pensar que o NO produzido pelo endotélio não sobreviveria o tempo suficiente para se difundir até o músculo liso, tornando o NO inativo pela reação rápida com a Hb liberada intravascularmente. Esse paradoxo biológico é resolvido pelas propriedades físicas do eritrócito, que limita a Hb com a compartimentalização pela membrana plasmática (SCHECHTER & GLADWIN, 2003), evitando o extravasamento da Hb para o plasma e o consumo de NO, em condições normais.

A arginina, o substrato para a síntese do NO é deficiente na AF (MORRIS *et al.*, 2000a; MORRIS *et al.*, 2000b). O consumo elevado de NO pela Hb livre no plasma e pelas ROS leva a diminuição na biodisponibilidade de NO que é ainda mais exacerbado pela

diminuição da disponibilidade do substrato da eNOS, a arginina. Esse estado de resistência ao NO é acompanhado pela regulação compensatória da síntese da eNOS e outros vasodilatadores independentes do NO (DIWAN *et al.*, 2002; KAUL *et al.*, 2004). Em condições de concentrações baixas de arginina, a enzima eNOS é desacoplada nas suas subunidades, produzindo ROS ao invés de NO, reduzindo ainda mais a biodisponibilidade de NO e aumentando o estresse oxidativo em pacientes com AF (XIA *et al.*, 1996). Estudos têm mostrado que a atividade da arginase é elevada em pacientes com AF quando comparada a indivíduos saudáveis (MORRIS *et al.*, 2000a; MORRIS *et al.*, 2005).

A arginase é uma enzima intracelular que pode ser encontrada no plasma somente após o dano ou morte celular. Sendo assim, a inflamação, os danos crônicos em órgãos e a hemólise são fontes em potencial para a liberação de arginase no plasma (MORRIS *et al.*, 2005). A atividade da arginase é mais elevada nos eritrócitos imaturos ou reticulócitos, os quais estão com contagem elevada nos indivíduos com AF (MORRIS *et al.*, 2002).

O estado inflamatório crônico que ocorre nos pacientes com DF é decorrente de diversos fatores que se interligam e se retroalimentam, formando um ciclo inflamatório permanente. Na última década foi dado foco maior a pesquisas relacionadas ao metabolismo do NO, uma vez que a hipótese de depleção dos seus níveis na microcirculação tem papel central na patogênese da vaso-oclusão e outras manifestações clínicas da AF. Isso ocorre, possivelmente, pela indução da vasoconstrição, ativação de plaquetas, adesão de leucócitos, dano vascular, geração de ROS e hipertensão pulmonar (BUNN *et al.*, 2010).

O processo de hemólise tem envolvimento na alteração da via arginina-NO. Sob condições normais, o eritrócito mantém a Hb no seu interior de forma segura; no entanto, durante a hemólise ocorre a liberação da Hb no plasma, onde rapidamente reage e destrói o NO (REITER *et al.*, 2002). Esse fenômeno irá resultar no consumo anormal elevado do NO e na formação de ROS e inibição da vaso-dilatação (Figura 2). A depleção do NO pela Hb

livre pode também causar dano adicional na função endotelial pela ativação transcricional de moléculas de adesão, incluindo VCAM-1 e E-selectina, além de vaso-constrictores potentes, como a endotelina-1 (ET-1) (ROTHER *et al.*, 2005). De fato, os níveis elevados de moléculas de adesão solúveis, tais como sVCAM-1, reflete o comprometimento da função endotelial, sendo que tal relação pode ser normalmente observada na biologia vascular da AF (KATO *et al.*, 2005).

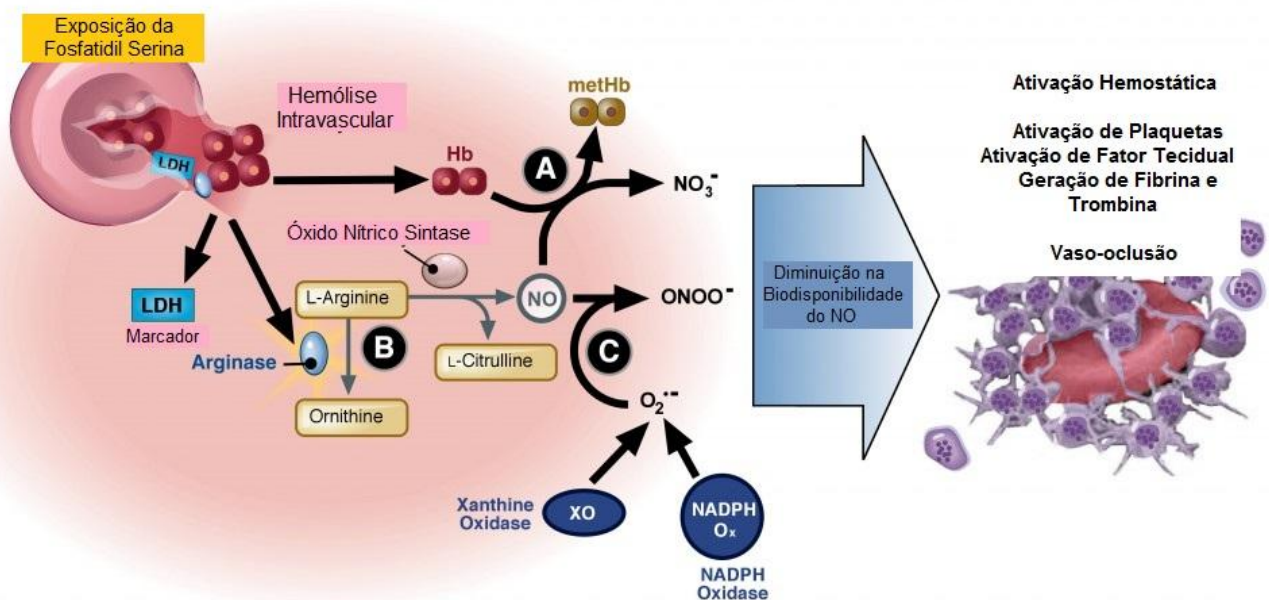


Figura 2. Representação das moléculas envolvidas na hemólise intravascular e bioatividade do NO na anemia falciforme (Adaptado de Steinberg, 2008). O processo de hemólise inicia um ataque global à via da arginina-NO. A hemoglobina livre e a formação de radicais livres rapidamente reagem e destroem o NO. A liberação de arginase pelo eritrócito depleta os níveis de arginina, principal substrato para a formação do NO, diminuindo ainda mais a síntese de NO levando às alterações vasculares e processo de vaso-oclusão.

O estresse oxidativo é outro mecanismo proeminente da vasculopatia da DF. Nas doenças hemolíticas, o eritrócito pode ser o determinante maior da condição *redox* do microambiente, sendo que na AF os eritrócitos têm concentrações maiores de ROS quando comparados a eritrócitos de indivíduos saudáveis (ASLAN & FREEMAN, 2004). A produção exacerbada de ROS, tal como o superóxido, por vias enzimáticas e não enzimáticas promove o estresse oxidativo intravascular que pode alterar a homeostase do NO e produzir peroxinitrito, que é um oxidante potente (WOOD *et al.*, 2008).

A exposição de PS e a alteração de lipídios da membrana eritrocitária de indivíduos com AF são processos conduzidos, em parte, pelo estresse oxidativo, que pode também contribuir para o curto período de circulação desses corpúsculos, tornando-os mais vulneráveis a quebra pela fosfolipase A2, um mediador inflamatório importante. A exposição da PS induz a adesão das hemácias ao endotélio vascular, facilitando o sequestro das hemácias com exposição da PS nos vasos sanguíneos; esse processo pode acentuar a disfunção vascular, a hemólise e o estado pró-trombótico (NEIDLINGER *et al.*, 2006).

A produção de ROS nos pacientes com AF é multifatorial, sendo que a isquemia tecidual, que ocorre durante os fenômenos de vaso-oclusão, pode iniciar eventos fisiopatológicos de isquemia-reperfusão que podem ser importantes na geração de ROS. Desta forma após a resolução da oclusão vascular, ocorre o aumento no fluxo de sangue, oxigênio e ROS, que pode causar danos oxidativos devido a reperfusão (MACK & KATO, 2006).

As lesões oxidativas podem resultar na peroxidação de lipídios da membrana, destruição celular e ativação do NF- κ B, que induz a expressão de moléculas de adesão endoteliais que se ligam às integrinas dos leucócitos e reticulócitos, resultando na aderência celular e causando mais vaso-oclusão e, posteriormente, exacerbção do ciclo de isquemia e reperfusão (ASLAN *et al.*, 2000). Evidências indicam que níveis elevados de ROS e,

conseqüentemente, da oxidação exagerada, aumenta a produção de citocinas pro-inflamatórias e de fatores de crescimento, alterando a permeabilidade vascular e favorecendo a adesão de leucócitos ao endotélio, que por sua vez, interferem na capacidade de relaxamento do músculo liso pelo NO vascular, causando disfunção endotelial (DROGE, 2002; ZARDI *et al.*, 2005).

1.5. HOMOCISTEÍNA COMO FATOR DE ALTERAÇÕES VASCULARES

A Homocisteína (Hcy) é um aminoácido que contém o grupo tiol, sendo derivado da metionina proveniente da dieta. Os níveis anormalmente elevados de Hcy têm sido descritos em pacientes com homocisteinemia que é fator de risco importante e independente para a ocorrência de doenças vasculares (CLARKE *et al.*, 1991). A possibilidade que a Hcy possa contribuir para os fenômenos isquêmicos na AF tem atraído grande interesse na quantificação dos níveis plasmáticos desse aminoácido em pacientes com esta doença (Dhar *et al.*, 2004).

Os níveis elevados de Hcy danificam a função vasodilatadora endotelial, em parte devido à diminuição da atividade do NO, prejudicando a resistência e a condução nos vasos. Esses danos podem ser decorrentes do aumento do estresse oxidativo que contribui para a depleção da bioatividade do NO (EBERHARDT *et al.*, 2000). Desta forma, a Hcy influencia em respostas vasculares múltiplas, incluindo alteração na coagulação sanguínea, alteração da função plaquetária, nas respostas relacionadas aos músculos lisos, tais como proliferação nos vasos e conseqüentemente, na função endotelial (EBERHARDT *et al.*, 2000).

Os níveis de Hcy podem diminuir dependendo das concentrações séricas de vitamina B12 e ácido fólico. Os indivíduos com AF apresentaram níveis elevados de homocisteína quando comparados com indivíduos controle, contribuindo ainda mais para alterações na

função endotelial e complicações isquêmicas presentes na doença (LOWENTHAL *et al.*, 2000).

1.6. CÉLULAS Th17

A AF é caracterizada pela ocorrência do estado pró-inflamatório, que apresenta o aumento na contagem de leucócitos, fator correlacionado com diversas complicações clínicas da doença, taxas de óbito entre os pacientes, além dos níveis elevados de citocinas pró-inflamatórias no plasma (PATHARE *et al.*, 2004). Os eventos isquêmicos produzidos pela oclusão de vasos maiores e menores envolvem interações entre os eritrócitos, leucócitos e endotélio, sendo que essas interações são reguladas por citocinas secretadas pelas células T, pelas moléculas de adesão e, conseqüentemente, pela resposta imune, que está envolvida na iniciação e desenvolvimento de crises na AF (MUSA *et al.*, 2010).

As células T helper 17 (Th-17) correspondem a um subtipo de células T CD4⁺, descoberto recentemente e que produz a interleucina 17 (IL-17) e apresenta papel importante nas respostas alérgicas e promoção de inflamação por indução de citocinas pró-inflamatórias variadas e quimiocinas, recrutamento de neutrófilos, indução na produção de anticorpos e ativação de células T (IWAKURA *et al.*, 2008).

O papel da IL-17 na disfunção vascular é controverso, sendo que Taleb e colaboradores (2009) descreveram que a IL-17 reduz a expressão de VCAM-1 e da infiltração de células T no vaso, limitando o desenvolvimento da aterosclerose. Em contrapartida, Eid e colaboradores (2009) mostraram que a IL-17 é produzida juntamente com o IFN-gama, promovendo infiltrado de célula T com indução de resposta pró-inflamatória. A IL-17 ainda é pouco estudada em relação a sua associação com fenômenos

clínicos na AF, quanto a sua expressão, modo de ação, indutores e principalmente com relação à sua contribuição para o perfil inflamatório descrito na doença.

2. JUSTIFICATIVA

2. JUSTIFICATIVA

A anemia falciforme é a doença hereditária mais comum no mundo, inclusive no Brasil, caracterizando-se como um problema de saúde pública. Os indivíduos com DF apresentam manifestações clínicas heterogêneas, incluindo complicações vaso-oclusivas, hemólise e infecções, podendo comprometer órgãos e reduzir a sua qualidade e expectativa de vida. Apesar da vaso-oclusão ser um evento chave na patogênese da AF, o papel da hemólise no mecanismo fisiopatológico da doença ainda precisa ser melhor esclarecido, bem como o de outros marcadores a ela relacionados.

O NO é um vasodilatador potente que regula a homeostase vascular, contribuindo para a patogênese da doença, sendo que a sua presença é importante para reduzir a ativação plaquetária e de moléculas de adesão no endotélio e a diminuição da proliferação do músculo liso, limitando os danos ao endotélio por isquemia e reperfusão, modulação na proliferação endotelial e regulação da inflamação.

Tendo em vista as consequências da depleção do NO na disfunção vascular, pode-se entender que a desregulação desta molécula é comum a mecanismos variados associados a vasculopatia presente na DF. Além disso, a regulação da via NOS/arginase que resulta na mudança metabólica da utilização da arginina, substrato para a síntese do NO, pode representar alvo novo no estudo da modulação dos fenômenos clínicos nos pacientes com AF. A análise de citocinas na AF pode nos mostrar mecanismos inflamatórios na doença. Neste estudo foi investigada a IL-17 e outras citocinas a ela associadas, uma vez que a sua relação com os fenômenos clínicos descritos na AF ainda é pouco conhecida, apesar do seu papel importante na promoção da inflamação por indução de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas distintas, recrutamento de neutrófilos, indução na produção de anticorpos e ativação de células T.

O papel da Hcy, como molécula associada as alterações vasculares descritas na AF também não é bem compreendida. A ligação dessa molécula aos marcadores de inflamação, hemólise e ativação endotelial pode mostrar uma nova via relacionada as alterações vasculares da AF.

Diante do exposto, as questões envolvidas no presente estudo podem gerar conhecimentos relativos ao estado patológico e imunológico apresentado pelos pacientes com AF, principalmente na disfunção endotelial, auxiliando assim no desenvolvimento de um monitoramento clínico eficaz e terapias mais adequadas.

3. OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

Investigar moléculas associadas à ativação endotelial, hemólise, inflamação, metabolismo da arginina e óxido nítrico e citocinas associadas às células Th-17 em pacientes com anemia falciforme.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar os níveis plasmáticos de arginase em pacientes com AF, associando-os ao quadro hemolítico apresentado pelos pacientes;

Avaliar marcadores bioquímicos relacionados à inflamação e hemólise (LDH, bilirrubinas, transaminases) nos pacientes com AF;

Avaliar a presença das citocinas IL-17, IL-18, TGF-b, IL-23 e IL-4 nos pacientes com AF e correlacionar com ativação endotelial e expressão de moléculas de adesão;

Avaliar a expressão de moléculas de adesão solúveis (sVCAM-1 e sICAM-1) em pacientes com AF;

Avaliar os níveis de homocisteína e sua associação com ativação endotelial e expressão de moléculas de adesão nos pacientes com AF.

Associar as citocinas IL-17, IL-18, TGF-b, IL-23 e IL-4 ao quadro clínico apresentado pelos pacientes com AF.

4. ARTIGOS

4. LISTA DE ARTIGOS

- **Artigo 1**

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.

Vilas-Boas W, Cerqueira BA, Zanette AM, Reis MG, Barral-Netto M, Goncalves MS

Publicado na revista *Annals Hematology*, 2010 - 89 (9): 877-82.

- **Artigo 2**

Homocysteine in sickle cell anemia: involvement with activation of soluble adhesion molecules and expression of Th17-related proinflammatory cytokines.

Wendell Vilas-Boas, Bruno A. V. Cerqueira, Angela M. D. Zanette, Jorge Clarencio, Mitermayer G. Reis, Marilda S. Goncalves

Artigo Submetido ao periódico revista *Blood Cells, Molecules, and Disease*, 2010.

- **Artigo 3**

Citocinas e Associação com Eventos Clínicos na Anemia Falciforme.

Wendell Vilas Boas, Bruno A. V. Cerqueira, Angela A. D. Zanette, Mitermayer G. Reis, Marilda S. Gonçalves

Publicado na revista *Gazeta Médica da Bahia*, 2010 – 80(3): 53-55

ARTIGO 1

Título

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.

Vilas-Boas W, Cerqueira BA, Zanette AM, Reis MG, Barral-Netto M, Goncalves MS

Publicado na revista *Annals Hematology*, 2010 - 89 (9): 877-82.

- Este artigo mostra a relação dos níveis séricos de arginase plasmáticas entre pacientes com anemia falciforme e controles saudáveis, e associa esta molécula a marcadores de hemólise, moléculas de adesão e citocinas relacionadas às células Th17.

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

Wendell Vilas-Boas · Bruno A. V. Cerqueira ·
Angela M. D. Zanette · Mitermayer G. Reis ·
Manoel Barral-Netto · Marilda S. Goncalves

Received: 13 January 2010 / Accepted: 23 March 2010
© The Author(s) 2010. This article is published with open access at Springerlink.com

Abstract Sickle cell anemia (SCA) is characterized by a marked endothelial dysfunction, owing to many factors. Arginine metabolism can be related to the inflammatory chronic state presented by patients, playing a key role in their clinical outcome and vascular endothelium. We investigated the serum arginase levels in 50 SCA patients (22 men and 28 women, mean age of 17 ± 10.5 years) and 28 healthy controls. Serum arginase levels were associated with biochemical hemolysis markers and cytokines involved in Th17 response, as well as levels of soluble intercellular adhesion molecule-1 (sICAM-1) and vascular cell adhesion molecule-1 (sVCAM-1). Arginase concentrations were higher in SCA patients, compared with controls ($p=0.005$), and were significantly and positively associated with total bilirubin ($p=0.004$), indirect bilirubin ($p=0.04$), and aspartate aminotransferase (AST; $p=0.039$) in the SCA patient group. Moreover, arginase was significantly and positively associated with transforming

growth factor-beta (TGF-beta; $p=0.008$) among SCA patients. sICAM-1 was significantly and positively associated to reticulocytes ($p=0.014$) and AST ($p=0.04$). sVCAM-1 was likewise associated with lactate dehydrogenase ($p=0.03$). These data suggest a new insight into arginase metabolism, as we show here a shift in arginine catabolism, where TGF-beta may induces the arginase pathway instead of the nitric oxide pathway and a possible involvement of the vascular activation and the serum arginase in chronic hemolysis among SCA patients. Additional studies should be carried out in order to investigate the mechanisms by which TGF-beta participates in the metabolism of arginase in SCA patients.

Keywords Sickle cell anemia · Arginine · Arginase · Th17 cells · Soluble adhesion molecules · TGF- β

Introduction

Sickle cell anemia (SCA) has been characterized by a chronic inflammatory state, with the presence of elevated leukocyte counts, abnormal activation of granulocytes, monocytes and endothelial cells, and an increased level of multiple inflammatory mediators. Cytokine expression may play a role in the clinical outcome of SCA patients. Its effects on vascular endothelium and adhesion molecule expression have been considered relevant [1–3].

Normal arginine metabolism is impaired in SCA, contributing to endothelial dysfunction and pulmonary hypertension [4]. Arginase catalyzes the hydrolysis of L-arginine into L-ornithine and urea. It is widely distributed in living organisms, utilizing arginine as its substrate [5]. In

WVB and BAVC contributed equally to this manuscript.

W. Vilas-Boas · B. A. V. Cerqueira · M. G. Reis ·
M. Barral-Netto · M. S. Goncalves (✉)
Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz/FIOCRUZ,
Rua Waldemar Falcão 121, Brotas,
Salvador, Bahia CEP. 40.295-001, Brazil
e-mail: mari@bahia.fiocruz.br

M. S. Goncalves
Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas/Faculdade de
Farmácia, Universidade Federal da Bahia,
Salvador, Brazil

A. M. D. Zanette
Fundação de Hematologia e Hemoterapia da Bahia—Hemoba,
Salvador, Brazil

Published online: 20 April 2010

 Springer

patients with SCA, and likely other hemolytic conditions, intravascular hemolysis contributes to endothelial dysfunction, which has been characterized by a reduction in nitric oxide (NO) bioavailability and NO resistance [6]. Given the important role of NO depletion in endothelial dysfunction, it is not surprising that NO dysregulation is a common finding among the varied mechanisms involved in sickle vasculopathy [7]. Arginase can be induced in many cell types by a variety of cytokines and inflammatory stimuli [8, 9].

Interleukin 17 (IL-17) is an essential proinflammatory T-cell-derived cytokine with several biological actions. It has been found to play a pivotal role in microbial host defense by interconnecting lymphoid and myeloid host defenses [10]. While previously considered to be dependent on interleukin-23 (IL-23) for differentiation from naive T cells into Th17 cells, recent work has indicated that initial differentiation is dependent on transforming growth factor-beta (TGF-beta), with subsequent expansion of the Th17 lineage dependent on IL-23 [11]. The role of the Th17 response in vascular alterations has not been established. Taleb et al. [12] showed that *in vivo* administration of IL-17 reduces endothelial vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) expression and vascular T-cell infiltration, and significantly limits the development of atherosclerotic lesions. However, Eid et al. [13] showed that IL-17 is produced concomitantly with interferon gamma (IFN-gamma) by coronary-artery-infiltrating T cells, which act synergistically to induce proinflammatory responses in vascular smooth muscle cells.

In macrophages, arginase gene expression is tightly regulated by many factors, including exogenous stimuli like the Th2 cytokines [14]. TGF-beta reduces the inducible NO synthase activity of rat macrophage cultures, not only down-regulating the inducible nitric oxide synthase pathway, but also up-regulating the arginase pathway [15].

In this study we tested the hypothesis that serum arginase concentration is influenced by some factors such as hemolysis, and Th17 responses and is related to endothelial dysfunction. We have tested that by evaluating hemolysis markers as bilirubin, lactate dehydrogenase (LDH) and aminotransferase, as well as cytokines involved in the Th17 response (IL-23, IL-17, and TGF-beta) and soluble adhesion molecules levels [soluble intercellular adhesion molecule-1 (sICAM-1) and vascular cell adhesion molecule-1 (sVCAM-1)].

Patients and methods

Subjects

We studied 50 patients (22 men and 28 women, mean age of 17 ± 10.5 years) from Northeast Brazil who were

diagnosed with SCA (*HBSS*) and were located at the Foundation of Hematology and Hemotherapy (HEMOBA) in Bahia, Brazil. All patients were at a steady state and were transfusion free. Patients showed no other systemic diseases that could have potentially altered their inflammatory profile functions. Blood samples were obtained during regular clinical visits. Twenty-eight healthy Brazilian subjects with normal hemoglobin profiles were included as a control group. The study was approved by the Oswaldo Cruz Foundation's Human Research Board and is in accordance with the Declaration of Helsinki of 1975, as revised in 2000. All subjects signed an informed consent form.

Biochemical analyses and serum arginase level measurements

Serum concentrations of bilirubin, LDH, aspartate aminotransferase (AST), and alanine aminotransferase (ALT) were determined using commercially available biochemical kits (LABTEST, Minas Gerais, Brazil). Arginase serum levels in SCA patients and control groups were measured using a Human Arginase I ELISA Kit (Cell science, Canton, MA, USA) according to the manufacturer's recommendations.

Cytokine and soluble adhesion molecule measurements

IL-23, IL-17, and TGF-beta were measured using Cytokine ELISA OptEIA kits (BD Pharmingen, San Diego, CA, USA) and soluble adhesion molecules were characterized using ELISA Kits (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA), according to the manufacturer's recommendations.

Statistical analysis

Baseline characteristics were summarized as means and proportions of selected variables. The distribution of quantitative variables was determined using the Kolmogorov-Smirnov test. Mean values of quantitative variables between groups were compared using the unpaired *t* test for normal data distribution and Mann-Whitney for non-normal data. The Kruskal-Wallis test or ANOVA with Bonferroni were used to compare means among two or more groups, as measured by interval variables. Bivariate correlation analyses were carried out to determine correlations between pairs of variables using Pearson's and Spearman's rank correlations (*r*). Linear regression analyses were also performed. All tests were considered significant if *p* values were less than 0.05. Data analyses were performed using Prism 5.01 (Graphpad Software, San Diego, CA, USA), EPIinfo 6.04 (CDC, Atlanta, Georgia, USA), and STATA SE 10 software (StataCorp, Texas, USA).

Results

Arginase levels were higher in SCA patient sera compared to controls

Serum arginase levels were quantified to determine the amount of arginase released into the blood. Arginase serum levels in SCA patients showed a twofold increase in enzyme levels, compared with control patients (median 21.1 and 14.7 ng/mL, respectively). This was found to be statistically significant ($p=0.005$; Fig. 1). Table 1 shows the hematologic and hemolysis markers values of the SCA patients group.

Correlation of arginase levels and hemolytic biochemical markers

The association between serum arginase concentrations and clinical hemolysis laboratory markers was determined to confirm the mechanisms that increase enzyme levels in SCA patients. Serum arginase levels were positively and significantly associated with total bilirubin ($p=0.004$, $r=0.397$), indirect bilirubin ($p=0.040$, $r=0.291$), and AST ($p=0.024$, $r=0.320$). Correlation analysis of AST showed a positive association with LDH ($p<0.001$, $r=0.59$) and total bilirubin ($p<0.001$, $r=0.49$).

Arginase was positively and significantly associated with a high expression of TGF-beta among SCA patients

In this work, we investigated cytokines involved in Th17 response and arginase expression regulation (e.g., IL-23,

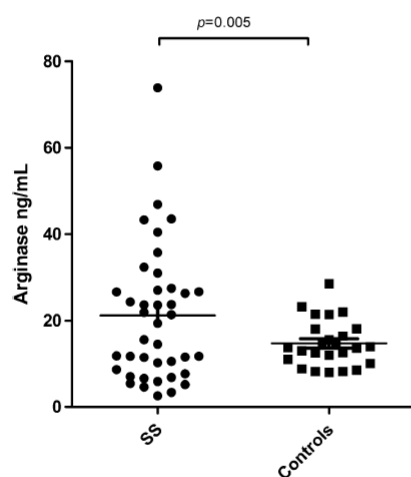


Fig. 1 Arginase serum levels between sickle cell anemia patients and control groups

Table 1 Steady-state hematologic and hemolysis markers values of the SCA patients group

	Median	SD
Hematology values		
RBC ($\times 10^6/\mu\text{L}$)	2.69	0.67
Hemoglobin (g/dL)	8.07	1.60
Hematocrit (%)	24.42	5.26
Platelets ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	368	178
Reticulocytes count (%)	6.9	3.1
Hemolysis markers		
Total bilirubin (mg/dL)	2.35	1.74
Direct bilirubin (mg/dL)	0.72	0.61
Indirect bilirubin (mg/dL)	1.64	1.35
AST (U/l)	44.55	29.96
ALT (U/l)	11.25	9.63

SD standard deviation, AST aspartate aminotransferase, ALT alanine aminotransferase

IL-17, and TGF-beta), associating these with free arginase in SCA individuals. There was a positive and significant association between arginase and TGF-beta ($p=0.008$, $r=0.588$), as shown in Table 2. The linear regression of arginase levels was also positively and significantly associated with AST ($p<0.0001$, $r=0.522$), total bilirubin ($p=0.034$, $r=0.301$), and indirect bilirubin ($p=0.039$, $r=0.293$; Fig. 2).

Rises in hemolytic rate is correlated to sVCAM-1 and sICAM-1 expression

We also studied vascular and leukocyte activation using sVCAM-1 and sICAM-1 serum level measurements. We found a positive and significant correlation among sICAM-

Table 2 Correlation between arginase serum levels, TH17-related cytokine, and soluble adhesion molecules levels in SCA patients

Cytokine	ARGINASE	
	<i>p</i> value	<i>r</i>
IL-23	0.459	0.181
IL-4	0.684	-0.100
IL-17	0.110	0.378
TGF-beta	0.008 ^a	0.588
Soluble adhesion molecules		
sICAM-1	0.192	-0.313
sVCAM-1	0.303	0.249

^a Spearman or Pearson correlation coefficient (*r*) and *p* values

sICAM-1 soluble intracellular adhesion molecule-1, sVCAM-1 soluble vascular cell adhesion molecule-1, TGF-beta transforming growth factor-beta

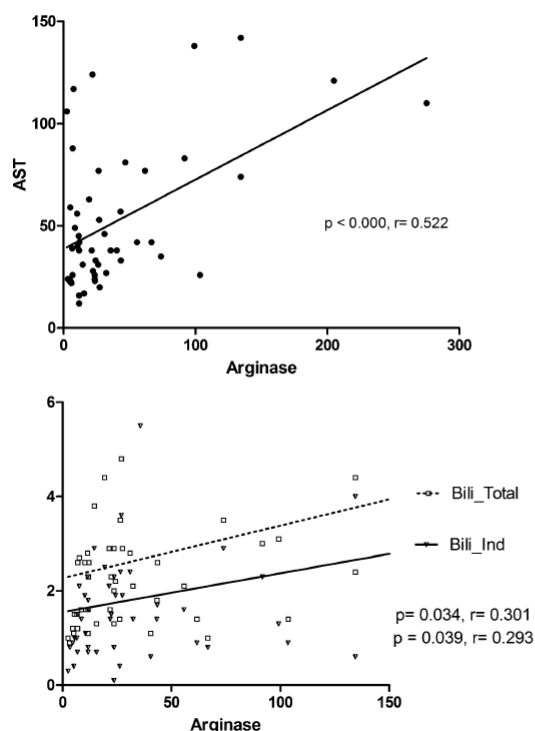


Fig. 2 Linear regression of arginase serum (ng/mL) and hemolysis markers in sickle cell anemia patients

1 and reticulocyte count ($p=0.014$, $r=0.270$), as well as with AST ($p=0.04$, $r=0.227$), which are both classical hemolysis markers. Moreover, soluble VCAM-1 levels were associated with an increase in LDH levels ($p=0.041$, $r=0.28$). No association was found between arginase and sVCAM-1 or sICAM-1 (Table 2).

Discussion

Results presented here demonstrate that free arginase levels in the sera of SCA patients are markedly increased when compared with healthy individuals. This is in agreement, in part, with a previous report that estimated the rise in arginase activity for SCA patients [4], while we have investigated the enzyme concentration and not its activity. A high concentration of free arginase in plasma is supposed to deplete the circulating L-arginine. It is known that adults with sickle cell disease are arginine deficient when in a steady state, also, plasma arginine concentrations significantly decrease in both adults and children during vaso-occlusive crisis and acute chest syndrome, and this effect is

associated with low NO metabolite levels [16]. Clinical trials with L-arginine supplementation appear to correct the NO deficiency and ameliorate pulmonary hypertension. In addition, red-cell adherence to the pulmonary endothelium appears to decrease with increasing NO [17, 18].

During hemolysis, free hemoglobin is decompartmentalized from the erythrocyte and is released into plasma, where it rapidly reacts with and destroys NO. This contributes to an abnormally high NO consumption and the formation of reactive oxygen species, ultimately inhibiting vasodilation. NO destruction by free hemoglobin can also contribute to impairment of vascular endothelial function via transcriptional activation of adhesion molecules, including VCAM-1 and E-selectin, as well as potent vasoconstrictors such as endothelin-1 [19]. Results presented here strongly suggest that the major source of free serum arginase released into plasma was the erythrocyte, as we found a positive correlation between hemolytic biochemical markers and arginase. Thus, a worsening in the clinical outcome can be observed by the simultaneous release of erythrocyte arginase during hemolysis, which will also limit the availability of arginine to NOS, contributing to a NO deficiency [4, 19]. In fact, this observation was supported by results from sVCAM-1 and sICAM-1, which were positively associated with hemolysis markers, such as AST, LDH, and reticulocyte count.

Characterizing NO metabolism is an important goal in SCA studies, as NO regulates blood vessel tone, endothelial adhesion, leukocytes, and platelet activity. These are important factors in ischemia-reperfusion injury and sickle-cell-induced ischemia. In sickle cell anemia more adhesion molecules are produced owing to a decreased availability of NO [20]. As part of the biochemical program that facilitates blood flow and maintains vascular homeostasis, NO normally suppresses the expression of VCAM-1, ICAM-1, and E-selectin. In fact, the impairment of NO bioavailability, which is associated with endothelial dysfunction, results in the pathological activation of endothelial cells to express adhesion molecules [21], contributing to new vaso-occlusive events. Morris et al. [4] showed an association between sVCAM-1 and arginase levels. NO acts as an anti-inflammatory mediator, affecting endothelial cell function by preventing leukocyte adhesion to the endothelium through the inhibition of adhesion molecule expression [22]. However, no correlation was found between such molecules in our results. This might be due to the clinical state of patients, who were in a steady state of the disease, at the moment of blood collection.

We also investigated the association of cytokines related to Th17 response and the extent of arginase release into the plasma. There is not much information concerning this topic in literature, and it has not been presented in the

context of SCA. Among the studied cytokines, there is no association between IL-23 and IL-17 concentrations with arginase levels. However, SCA individuals with increased levels of TGF-beta had the highest levels of serum arginase. This is an intriguing result, considering that the NO metabolic pathway in murine macrophages is a key defense element for various infectious diseases. Also, its role in diverse settings of immunopathology has been firmly established [23]. Arginase activity in macrophages is exclusively up-regulated in association with cytokines involved in the Th2 immune response, including the cytokines IL-4 and IL-10 [9, 24], as well as IL-13 and TGF-beta [25]. TGF-beta has effects on cell proliferation and apoptosis, as well as on the response to tissue injury, infection, bone homeostasis, endothelial growth, pulmonary fibrosis, inflammation, immune regulation, and extracellular matrix synthesis [26]. Our work reinforces the model that the arginase pathway is regulated by TGF-beta. This is true not only for its immune response role, as previously described, but also in other types of tissue that are involved in arginase metabolism. Naive T-cell differentiation into Th17 cells is driven initially by TGF-beta [11]. The lack of association among arginase and Th17-related cytokines may be due to a secondary role that these cytokines can perform in arginine metabolism, mainly when patients are in a steady state of the disease.

The clinical outcomes of SCA patients are a consequence of several events and can also be influenced by genetic diversity. With this respect, the reciprocal regulation of the NOS/arginase pathway that results in a metabolic shift in arginine utilization, a key endogenous substrate of both enzymes, may represent an important target to modulate clinical symptoms and a further therapeutic approach for SCA patients.

Acknowledgments This work was supported by grants from the Brazilian National Council of Research (CNPq; 3065427/2007-5 and 484457/2007-1; M.S.G.), the Foundation of Research of Bahia (FAPESB; 1431040053063 and 9073/2007; M.S.G.). The sponsors of this study are public or nonprofit organizations that support science in general. They had no role in gathering, analyzing, or interpreting the data.

Open Access This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Noncommercial License which permits any noncommercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author(s) and source are credited.

References

1. Heibel RP, Osarogiagbon R, Kaul D (2004) The endothelial biology of sickle cell disease: inflammation and a chronic vasculopathy. *Microcirculation* 11:129–151
2. Okpala I (2004) The intriguing contribution of white blood cells to sickle cell disease—a red cell disorder. *Blood Rev* 18:65–73. doi:10.1016/S0268-960X(03)00037-7
3. Telen MJ (2007) Role of adhesion molecules and vascular endothelium in the pathogenesis of sickle cell disease. *Hematology Am Soc of Hematol Educ Program* 84–90
4. Morris CR, Kato GJ, Poljakovic M et al (2005) Dysregulated arginine metabolism, hemolysis-associated pulmonary hypertension and mortality in sickle cell disease. *JAMA* 294:81–90. doi:10.1001/jama.294.1.81
5. Iyamu EW, Cecil R, Parkin L, Woods G, Ohene-Frempong K, Asakura T (2005) Modulation of erythrocyte arginase activity in sickle cell disease patients during hydroxyurea therapy. *Br J Haematol* 131:389–394. doi:10.1111/j.1365-2141.2005.05772
6. Gladwin MT, Kato GJ (2005) Cardiopulmonary complications of sickle cell disease: role of nitric oxide and hemolytic anemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 51–57 doi:10.1182/asheducation-2005.1.51
7. Wood KC, Hsu LL, Gladwin MT (2008) Sickle cell disease vasculopathy: a state of nitric oxide resistance. *Free Radic Biol Med* 44:1506–1528. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2008.01.0085
8. Morris SM Jr (2002) Regulation of enzymes of the urea cycle and arginine metabolism. *Annu Rev Nutr* 22:87–105. doi:10.1146/annurev.nut.22.110801.140547
9. Corraliza IM, Soler G, Eichmann K, Modolell M (1995) Arginase induction by suppressors of nitric oxide synthesis (IL-4, IL-10 and PGE2) in murine bone marrow-derived macrophages. *Biochem Biophys Res Commun* 206:667–673
10. Schwarzenberger P, Kolls JK (2002) Interleukin 17: an example for gene therapy as a tool to study cytokine mediated regulation of hematopoiesis. *J Cell Biochem* 38(Suppl):88–95
11. Stockinger B, Veldhoen M (2007) Differentiation and function of Th17 cells. *Curr Opin Immunol* 19:281–286. doi:10.1016/j.coi.2007.04.005
12. Taleb S, Romain M, Ramkhalawon B, Uytendhove C, Pasterkamp G, Herbin O et al (2009) Loss of SOCS3 expression in T cells reveals a regulatory role for interleukin-17 in atherosclerosis. *J Exp Med* 206:2067–2077. doi:10.1084/jem.20090545
13. Eid RE, Rao DA, Zhou J, Lo SF, Ranjbaran H, Gallo A et al (2009) Interleukin-17 and interferon-gamma are produced concomitantly by human coronary artery-infiltrating T cells and act synergistically on vascular smooth muscle cells. *Circulation* 119:1424–1432. doi:10.1161/circulationaha.108.827618
14. Pauleau AL, Rutschman R, Lang R, Pernis A, Watowich SS et al (2004) Enhancer-mediated control of macrophage-specific arginase I expression. *J Immunol* 172:7565–7573
15. Mills CD, Kincaid K, Alt JM, Heilman MJ, Hill AM (2000) M-1/M-2 macrophages and the Th1/Th2 paradigm. *J Immunol* 164:6166–6173
16. Morris CR, Kuypers FA, Larkin S, Vichinsky E, Styles L (2000) Patterns of arginine and nitric oxide in sickle cell disease patients with vaso-occlusive crisis and acute chest syndrome. *J Pediatr Hematol Oncol* 22:515–520
17. Morris CR, Morris SM Jr, Hagar W, Van Warmerdam J, Claster S, Kepka-Lenhart D, Machado L, Kuypers FA, Vichinsky EP (2003) Arginine therapy: a new treatment for pulmonary hypertension in sickle cell disease? *Am J Respir Crit Care Med* 168:63–69. doi:10.1164/rccm.200208-967OC
18. Morris CR, Kuypers FA, Larkin S et al (2000) Arginine therapy: a novel strategy to induce nitric oxide production in sickle cell disease. *Br J Haematol* 111:498–500. doi:10.1111/j.1365-2141.2000.12403
19. Rother RP, Bell L, Hillmen P, Gladwin MT (2005) The clinical sequelae of intravascular hemolysis and extracellular plasma hemoglobin: a novel mechanism of human disease. *JAMA* 293:1653–1662
20. Vichinsky E (2002) New therapies in sickle cell disease. *Lancet* 360:629–631

-
21. Lee SK, Kim JH, Yang WS, Kim SB, Park SK, Park JS (2002) Exogenous nitric oxide inhibits VCAM-1 expression in human peritoneal mesothelial cells. Role of cyclic GMP and NF-kappaB. *Nephron* 90:447–454. doi:10.1159/000054733
 22. Nabah YN, Mateo T, Cerda-Nicolas M, Alvarez A, Martinez M, Issekutz AC, Sanz MJ (2005) L-NAME induces direct arteriolar leukocyte adhesion, which is mainly mediated by angiotensin-II. *Microcirc* 12:443–453. doi:10.1080/10739680590960962
 23. MacMicking J, Xie QW, Nathan C (1997) Nitric oxide and macrophage function. *Annu Rev Immunol* 15:323–350. doi:10.1146/annurev.immunol.15.1.323
 24. Modolell M, Corraliza IM, Link F, Soler G, Eichmann K (1995) Reciprocal regulation of nitric oxide synthase/arginase balance in mouse bone marrow-derived macrophages by Th1 and Th2 cytokines. *Eur J Immunol* 25:1101–1104
 25. Munder M, Eichmann K, Modolell M (1998) Alternative metabolic states in murine macrophages reflected by the nitric oxide synthase/arginase balance: competitive regulation by CD4+ T cells correlates with Th1/Th2 phenotype. *J Immunol* 160:5347–5354
 26. Ziyadeh FN (2004) Mediators of diabetic renal disease: the case for TGF-Beta as the major mediator. *J Am Soc Nephrol* 15(Suppl 1): S55–S57. doi:10.1097/01.asn.0000093460.24823.5B

ARTIGO 2

Título

Homocysteine in sickle cell anemia: involvement with activation of soluble adhesion molecules and expression of Th17-related proinflammatory cytokines.

Wendell Vilas-Boas, Bruno A. V. Cerqueira, Angela M. D. Zanette, Jorge Clarencio, Mitermayer G. Reis, Marilda S. Goncalves

Artigo Submetido ao periódico revista *Blood Cells, Molecules, and Disease*, 2010.

- Este manuscrito descreve a associação da homocisteína com marcadores de ativação endotelial e inflamatórios na AF. Sugerindo uma provável contribuição da homocisteína no mecanismo de vaso-oclusão na AF.

Homocysteine in sickle cell anemia: involvement with activation of soluble adhesion molecules and expression of Th17-related proinflammatory cytokines

Wendell Vilas-Boas¹, Bruno A. V. Cerqueira¹, Angela M. D. Zanette³, Jorge Clarencio¹, Mitermayer G. Reis¹, Marilda S. Goncalves^{1,2}

¹Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz/FIOCRUZ, Salvador, Brasil.

²Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas/Faculdade de Farmácia/Universidade Federal da Bahia, Salvador, Brasil

³Fundacao de Hematologia e Hemoterapia da Bahia - Hemoba, Salvador, Brasil

Corresponding Author:

Marilda Souza Goncalves, Ph.D.

Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz / FIOCRUZ

Rua Waldemar Falcão 121. Brotas

Salvador, Bahia, Brazil CEP. 40.295-001

Tel: 55-71-3176-2226

FAX: 55-71-3176-2326

E-mail: mari@bahia.fiocruz.br

*** WV B and BA VC contributed equally to this manuscript**

Abstract

The possibility that homocysteine (Hcy) may contribute to the pathogenesis presented by sickle cell anemia (SCA) patients has attracted scientific interest, specifically with regard to the hypothesis that plasma Hcy may increase the endothelial activation and inflammatory status of these individuals. We studied the Hcy levels of 38 SCA patients, as well as the expression levels of inflammatory and endothelial activation markers. We found significant associations between Hcy levels and increased expression of IL-17 and TGF-beta among SCA patients and a positive significant correlation between Hcy and sVCAM. SCA individuals had raised IL-17 levels when compared to controls. Our data support the hypothesis that Hcy levels contribute to the vascular inflammation and activation presented by SCA patients and probably has an important role in vaso-occlusive mechanism. This might be considered as an important component of the pathogenesis of this very well known disease.

Keywords: Sickle cell anemia, homocysteine, soluble adhesion molecules, cytokines

Introduction

Homocysteine (Hcy), a sulfur-containing amino acid, is found at low concentration in blood and cells and is an important intermediate molecule involved in the biosynthesis of methionine and cysteine [1]. The high plasma concentration of Hcy is a well-established risk factor for several disorder including cardiovascular disease (CVD) and stroke [2], venous thrombosis and arteriosclerosis [3]. Genetic and nutritional factors, along with drugs, are important determinants of Hcy metabolism, and the potential interactions between these factors may be related to increase Hcy levels [4-5]. Nutritional deficiencies of vitamin B12 and folic acid can also lead to elevated plasma homocysteine concentration [6]. Of these causes, folate deficiency seems to be the most plausible in patients with sickle cell anemia (SCA), who have a high folate requirement due to an increased red cell turnover [7].

Most diseases related to Hcy metabolism deregulation have been associated with elevated levels of inflammatory components. However, much remains to be elucidated with respect to the folate/Hcy ratio and its association with the presence of inflammatory mediators such as chemokines that promote direct migration of inflammatory cells to the site of injury [8]. Hyperhomocysteinemia has an important role in vascular disorders and may act through increasing cytotoxic activity, especially for endothelial cells; elevating H₂O₂ levels and decreasing nitric oxide (NO) synthesis, inducing cytokine production to stimulate the inflammatory state, activation of procoagulant factors and dysregulation of lipid metabolism via oxidative modification of low density lipoprotein-cholesterol (LDL-C) with enhanced atherogenesis. Higher levels of Hcy have also been implicated in causing changes in the rheological properties of blood such as decreasing antithrombin III and tissue plasminogen activator (TPA) and increasing factor VII and C-protein [9-10]. Additionally, Hcy is reported to enhance endothelial leukocyte interactions [11].

The possibility that Hcy may contribute to the ischemic phenomena present in SCA has attracted some interest in plasma total homocysteine. Lowenthal *et al.* [12] showed that the median plasma concentration of homocysteine among subjects with SCA was approximately 1.5-fold higher than that of controls. Additionally, sickle cell disease (SCD) patients have higher plasma concentrations of Hcy in spite of elevated plasma folate levels and vitamin B12 concentrations similar to those observed in controls.

Since patients with SCA are prone to ischemic complications, we hypothesized that the plasma Hcy may contribute to increases the endothelial activation and inflammatory states seen in these individuals. We performed a study to assess serum concentrations of Hcy, inflammatory markers such as IL-18, IL-23, IL-17, TGF-beta and soluble adhesion molecules (sICAM and sVCAM) in SCA patients.

Methods

Subjects

We studied 62 patients (28 men and 34 women, mean age of 21 ± 14) from Northeast, Bahia, Brazil who were diagnosed with SCA (HbSS) and were followed at the Hematology ambulatory from the Foundation of Hematology and Hemotherapy (HEMOBA). All patients maintained a steady-state, transfusion-free treatment course with the use of 1 mg of oral folate supplementation. Patients had no other systemic diseases that could have potentially altered their inflammatory functions. Blood samples were obtained during regular clinical visits. The study was approved by the Oswaldo Cruz Foundation's Human Research Board and is in accordance with the Declaration of Helsinki of 1975, as revised in 2000. All subjects signed informed consent forms. It was included 40 age-matched control group individuals for the IL-17 analysis.

Biochemical analyses of Homocysteine

Serum concentrations of Hcy were measured by a chemiluminescence immunoassay using the automatic device IMMULITE 2000 (Diagnostic Products Corporation, Los Angeles, CA, USA), according to the manufacturer's instructions.

Cytokine and soluble adhesion molecule measurements

The IL-18, IL-23, IL-7 and TGF-beta serum levels were measured using Cytokine ELISA OptEIA kits (BD Pharmingen, San Diego, CA, USA), and soluble adhesion molecules (sICAM and sVCAM) were characterized using ELISA Kits (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA), according to the manufacturer's recommendations.

Statistical Analysis

Baseline characteristics were summarized as means and proportions of selected variables. The distribution of quantitative variables was determined using the Kolmogorov-Smirnov test. Bivariate correlation analyses were carried out to determine correlations between pairs of variables using Pearson's or Spearman's rank correlations (r), two-tailed test was used. The non-parametric Kruskal-Wallis test was used to compare two or more groups as measured by interval variables. All tests were considered significant if p values obtained were less than 0.05. Data analyses were performed using the software programs STATA 10 (StataCorp, Texas, USA) and GraphPad Prism 5 (Graphpad Software, San Diego, CA).

Results

The data of steady-state hematologic markers, soluble adhesion molecules and cytokine values of the SCA group are represented in Table 1.

Hcy concentration, cytokine profile and adhesion molecules

The median of Hcy concentration in the SCA group was 7.3 $\mu\text{mol/L}$ (\pm 3.3 $\mu\text{mol/L}$). Considering the classification commonly used for the degree of homocysteinemia as normal (5–14 $\mu\text{mol/L}$) and hyperhomocysteinemia as mild (15–30 $\mu\text{mol/L}$), moderate (31–100 $\mu\text{mol/L}$), and severe (>100 $\mu\text{mol/L}$) [13], hyperhomocysteinemia was not found among the studied patient group. The association between cytokines and Hcy serum levels revealed a significant positive association between IL-17 and TGF-beta with Hcy concentration in the SCA group ($p= 0.019$, $r=0.38$ and $p=0.027$, $r= 0.610$ respectively). However, IL-18 and IL-23 levels were not associated with Hcy concentration in this group (Fig. 1).

To assess the hypothesis that Hcy is related to vascular activation, it was performed analysis with soluble adhesion molecules. The association between soluble vascular and cellular adhesion molecules (sVCAM and sICAM) with Hcy showed a significant positive correlation with sVCAM ($p= 0.014$, $r=0.396$) but not with sICAM (Fig. 2). When we considered the mean concentrations of Hcy in the 50th and 75th percentiles as a cut-off point, we can also report a statistically significant association between the sVCAM concentration and Hcy levels in these patients ($p= 0.021$, $\chi^2=5.28$ and $p= 0.031$, $\chi^2=4.64$, respectively).

The analysis of IL-17 levels in the 25th and 75th percentiles of Hcy, in the patients, confirm the positive correlation between them ($p= 0.047$) (Fig. 4).

IL-17 levels are increased in patient group

SCA patients presented raised levels of IL-17 cytokine compared to control group ($p= 0.011$) (Fig. 3).

Discussion

A chronic inflammatory state in vascular tissue is recognized to contribute to thrombotic and vaso-occlusive events in SCA. Since Hcy has been associated with vascular complications in the pathology of other diseases, it may contribute to the vascular complications presented by patients with sickle cell disease.

In our study, we investigated the association of Hcy levels and markers of vascular activation like cytokines, soluble adhesion molecules and neutrophil surface molecules in SCA patients. Our results related to Hcy analyses showed that the studied group did not present increased levels of Hcy (7.3 $\mu\text{mol/L}$) when compared with previous results from Lowenthal et al. [12] that found a mean concentration of 12.6 $\mu\text{mol/L}$ among sickle cell disease patients, or when compared to the common classification criterion for hyperhomocysteinemia ($>14 \mu\text{mol/L}$) [13]. However, Balasa et al. [19] found Hcy levels even lower (5.8 $\mu\text{mol/L}$) in SCA patients and there was no difference with controls. Despite folic acid use by our patients, it seems that folate status and supplementation were not determinative for Hcy status in SCA and hyperhomocysteinemia often existed despite folic acid supplementation [14]. In this work, we did not perform a control group to compare Hcy levels of SCA patients, but previous work by our team carried out a cross-sectional study comprising 143 healthy neonates, from the same population, that showed Hcy mean levels about 7.4 $\mu\text{mol/L}$ in this group [20], showing that in the SCA group investigated, the Hcy levels are not elevated when compared to their own population.

The effect on cytokine production induced by Hcy is not well understood. We found a positive association between Hcy and that of IL-17 and TGF-beta. IL-17 promotes inflammation by induction of various proinflammatory cytokines and chemokines, recruitment of neutrophils, enhancement of antibody production, and activation of T cells [15]. TGF-beta is a pleiotropic cytokine involved in several human diseases, including

cardiovascular disease, and also can induce IL-17 production [16]. Our results suggest a possible role of Hcy in the induction of TGF-beta and IL-17. This hypothesis is supported by Su *et al.* who proposed that homocysteine may contribute to the initiation and progression of vascular disease by monocyte activation, resulting in the secretion of cytokines that amplify the inflammatory response [17]. We also found an elevated basal level in SCA patients of IL-17 compared to controls, showing the chronic inflammatory state in these SCA individuals also represented by IL-17 expression.

A new field of research in SCA is rising on Th17 cells. These producing IL-17-cells are involved in inflammatory response and a little information is available regarding studies in SCA. Thus, it becomes important to investigate the role of this cytokines in the endothelial dysfunction and activation, once the role of other molecules, such as IL-1 and TNF-alpha, are well established. Another work of our team also showed a significantly and positively association of TGF-beta and the circulating arginase levels in SCA patients, showing a vascular relevance of this cytokine and the need to clarify the role of this molecules in SCA [18].

We found lower levels of IL-17 and TGF-beta in this study when compared to others works [21,22]. These discrepancies can be seemed due to differences in the genetic background found in the different population. More importantly, the IL-17 control group in this work is age-matched and from the same population than patients. Many patients and controls had undetectable IL-17, for this reason, the levels of this cytokine appear low.

We believe that the role of Hcy in cytokine production and oxidative stress in the endothelium explains our findings related to the increase of sVCAM expression and consequently with the vascular activation currently described among the SCA individuals with the highest Hcy serum levels.

We conclude that the role of Hcy in vascular damage in SCA patients might be considered as an important part of the pathogenesis of this disease and additional studies including SCA patients under vaso-occlusive crises are warranted in order to confirm our findings and compare the levels of these molecules in crisis condition with those in steady-state status. More importantly, cross-sectional studies such as ours cannot determine the central question with reference to influence of Hcy on vascular damage in SCA. Longitudinal studies can be helpful to answer such questions.

Acknowledgments

This work was supported by grants from the Brazilian National Council of Research (CNPq) (3065427/2007-5 and 484457/2007-1) (M.S.G.); the Foundation of Research and Extension of Bahia (FAPESB) (1431040053063 and 9073/2007) (M.S.G.); and MCD/CNPq/MS-SCTIE-DECIT (409800/2006-6), (M.S.G.). The sponsors of this study are public or nonprofit organizations that support general science research. They had no role in gathering, analyzing or interpreting the data.

References

1. M. Bialecka, P. Robowski, K. Honczarenko, A. Roszmann, J. Sławek, Genetic and environmental factors for hyperhomocysteinaemia and its clinical implications in Parkinson's disease, *Neurol. Neurochir. Pol.* 43 (2009) 272-285.
2. H. Refsum, P.M. Ueland, O Nygard, S.E Vollset, Homocysteine and cardiovascular disease, *Annu. Rev. Med.* 49 (1998) 31–62.
3. R. Clarke, L. Daly, K. Robinson, E. Naughten, S. Cahalane, B. Fowler, I. Graham, Hyperhomocysteinemia: An independent risk factor for vascular disease, *N. Eng. J. Med.* 334 (1991) 1149–1155.
4. L.A. Kluijtmans, I.S. Young, C.A. Boreham, L. Murray, D. McMaster, H. McNulty, J.J. Strain, J. McPartlin, J.M. Scott, A.S Whitehead, Genetic and nutritional factors contributing to hyperhomocysteinemia in young adults, *Blood* 101 (2003) 2483-2488.
5. S. Zoccolella, P. Lamberti, G. Iliceto, C. Dell'Aquila, C. Diroma, A. Fraddosio, S.V. Lamberti, E. Armenise, G. Defazio, M. de Mari, P. Livrea, Elevated plasma homocysteine levels in L-dopa -treated Parkinson's disease with dyskinesias, *Clin. Chem. Lab. Med.* 44 (2006) 863-866.
6. M. den Heijer, T. Koster, H.J. Blom, G.M. Bos, E. Briet, P.H. Reitsma, J.P. Vandenbroucke, F.R. Rosendaal, Hyperhomocysteinemia as a risk factor for deep-vein thrombosis, *N. Eng. J. Med.* 334 (1996) 759–762.
7. J. Lindenbaum, Folic acid requirement in situations of increased need, in: *Folic acid: biochemistry and physiology in relation to the human nutrition requirement*, National Academy of Sciences, Washington, D.C. 1977. p 256–276.
8. A.L. Hammons, C.M. Summers, J.V. Woodside, H. McNulty, J.J. Strain, I.S. Young, L. Murray, C.A. Boreham, J.M. Scott, L.E. Mitchell, A.S. Whitehead, Folate/homocysteine

phenotypes and MTHFR 677C>T genotypes are associated with serum levels of monocyte chemoattractant protein-1, *Clin. Immunol.* 133 (2009) 132-137.

9. A. Siniscalchi, F. Mancuso, L. Gallelli, G.F. Ibbadu, N.B. Mercuri, G. De Sarro, Increase in plasma homocysteine levels induced by drug treatments in neurologic patients, *Pharmacol. Res.* 52 (2005) 367-375.

10. R.B. Postuma, A.E. Lang, Homocysteine and levodopa: should Parkinson disease patients receive preventative therapy? *Neurology* 63 (2004) 886-891.

11. N.P. Dudman, S.E. Temple, X.W. Guo, W. Fu, M.A. Perry, Homocysteine enhances neutrophil-endothelial interactions in both cultured human cells and rats in vivo, *Circulation Research* 84 (1999) 409–416.

12. E.A. Lowenthal, M.S. Mayo, P.E. Cornwell, D. Thornley-Brown, Homocysteine elevation in sickle cell disease, *J. Am. Coll. Nutr.* 19 (2000) 608-612.

13. M. Hansrani, J.I. Gillespie, G. Stansby, Homocysteine in myointimal hyperplasia, *Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg.* 23 (2002) 3–10.

14. M. Dhar, R. Bellevue, S. Brar, R. Carmel, Mild hyperhomocysteinemia in adult patients with sickle cell disease: a common finding unrelated to folate and cobalamin status, *Am. J. Hematol.* 76 (2004) 114-120.

15. Y. Iwakura, S. Nakae, S. Saijo, H. Ishigame, The roles of IL-17A in inflammatory immune responses and host defense against pathogens, *Immunol. Rev.* 226 (2008) 57-79.

16. J. Rodríguez-Vita, E. Sánchez-Galán, B. Santamaría, E. Sánchez-López, R. Rodrigues-Díez, L.M. Blanco-Colio, J. Egido, A. Ortiz, M. Ruiz-Ortega, Essential role of TGF-beta/Smad pathway on statin dependent vascular smooth muscle cell regulation, *PLoS One* 3 (2008) 3959.

17. S.J. Su, L.W. Huang, L.S. Pai, H.W. Liu, K.L. Chang, Homocysteine at pathophysiologic concentrations activates human monocyte and induces cytokine expression and inhibits macrophage migration inhibitory factor expression, *Nutrition* 21 (2005) 994-1002.
18. W. Vilas-Boas, B.A. Cerqueira, A.M. Zanette, M.G. Reis, M. Barral-Netto, M.S. Goncalves MS, 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. Hematol.* 89 (2010) 877-882
19. V.V. Balasa, R.A. Gruppo, P.S. Gartside, K.A. Kalinyak, Correlation of the C677T MTHFR genotype with homocysteine levels in children with sickle cell disease, *J Pediatr. Hematol. Oncol.* 21 (1999) 397-400.
20. F.D. Couto, L.M. Moreira, D.B. Dos Santos, M.G. Reis, M.S. Gonçalves. Folate, vitamin B12 and total homocysteine levels in neonates from Brazil, *Eur. J. Clin. Nutr.* 61 (2007) 382-386.
21. K. Asare, B.E. Gee, J.K. Stiles, N.O. Wilson, A. Driss, A. Quarshie, R.J. Adams, A. Kutlar, J.M. Hibbert. Plasma interleukin-1beta concentration is associated with stroke in sickle cell disease, *Cytokine.* 49 (2010) 39-44.
22. H. Croizat, R.L. Nagel. Circulating cytokines response and the level of erythropoiesis in sickle cell anemia, *Am J Hematol.* 60 (1999) 105-15.

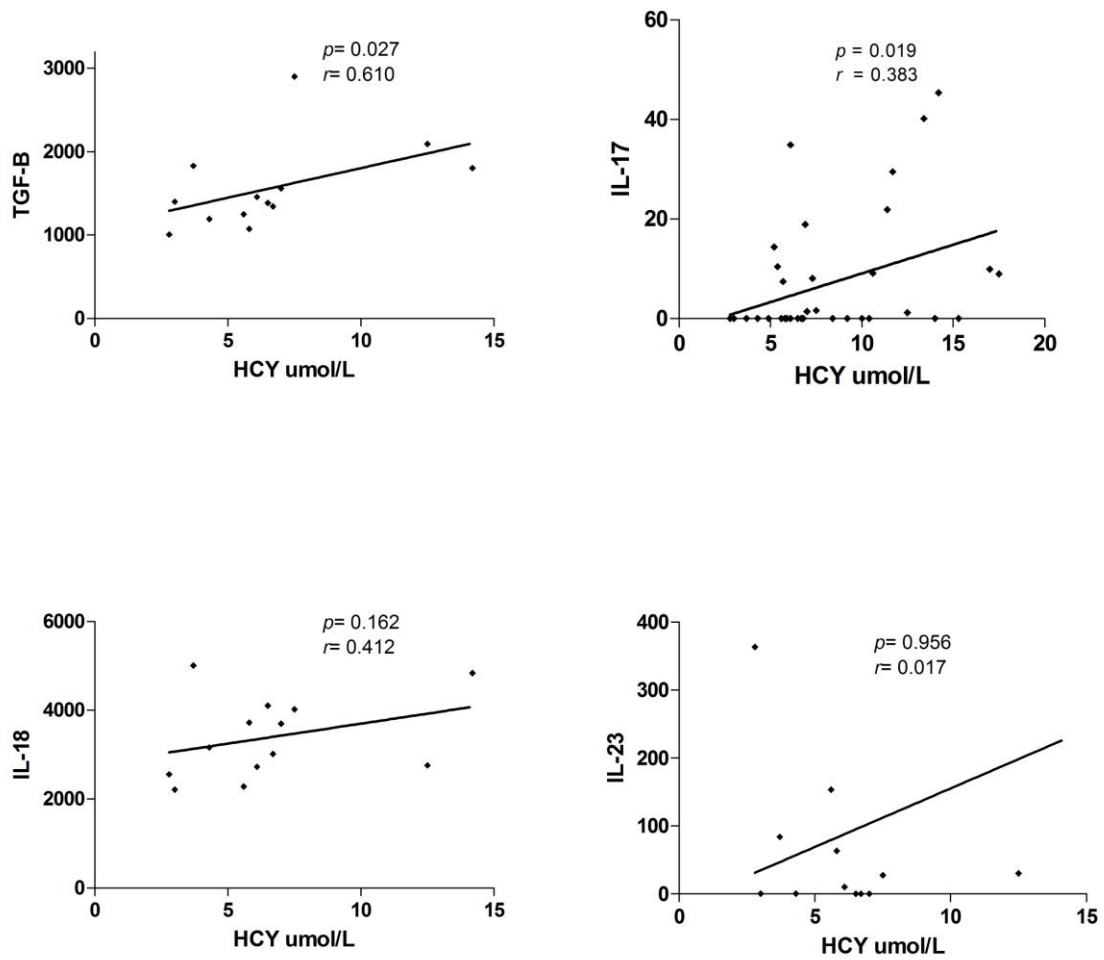


Figure 1. Homocysteine levels and correlation with TGF-beta, IL-17, IL-18 and IL-23 cytokines in SCA patients.

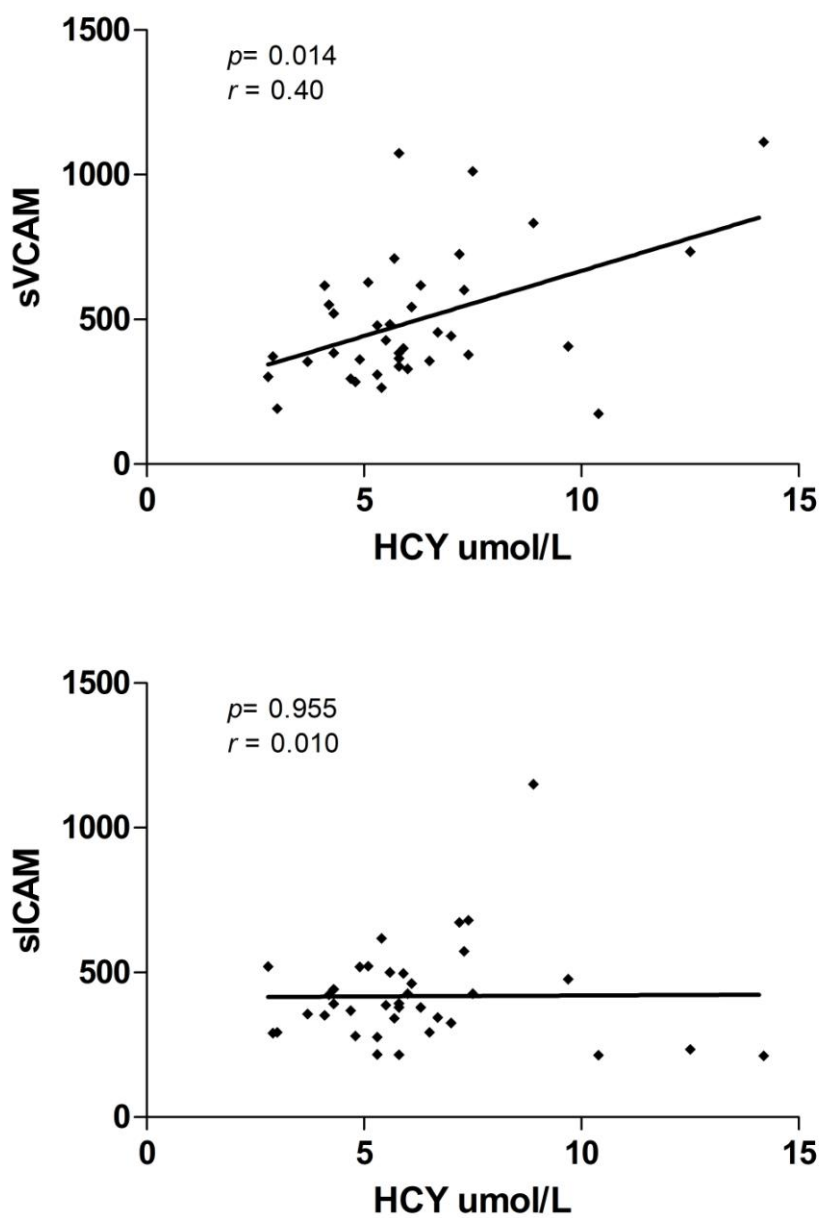


Figure 2. Homocysteine levels and correlation with adhesion molecules in SCA patients

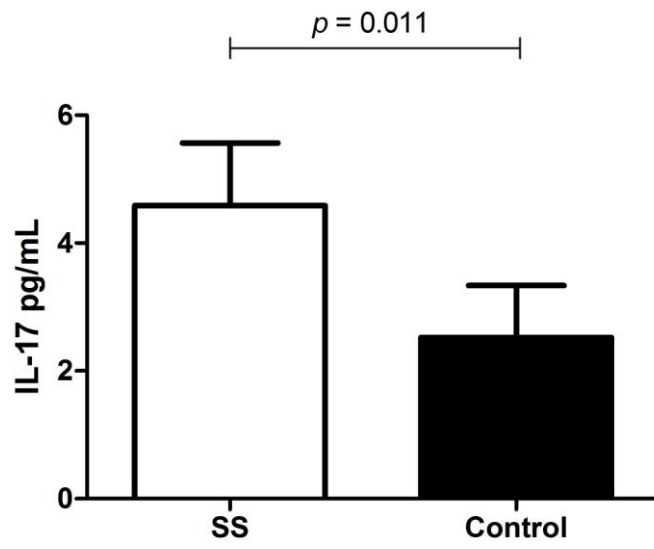


Figure 3. Levels of IL-17 in SCA individuals and controls.

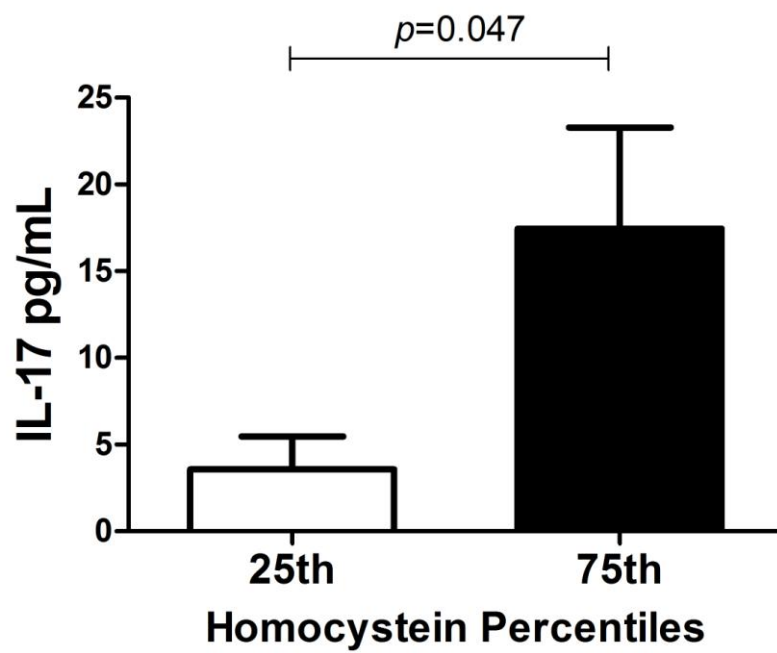


Figure 4. Homocystein percentiles and levels of IL-17 in SCA individuals.

Table 1- Steady state hematologic markers, soluble adhesion molecules and cytokine values of the SCA patient group.

	<i>Mean</i>	<i>SD</i>
Hematologic markers		
RBC (x10 ⁶ / μ L)	2.69	0.67
Hemoglobin (g/dL)	8.07	1.60
Hematocrit (%)	24.42	5.26
Platelets (x10 ³ / μ L)	368	178
Leukocytes (10 ⁶ /mL)	10.9	3.7
Reticulocytes count (%)	6.9	3.1
Cytokines		
IL-18 (pg/mL)	3556.81	1279
TGF-beta (pg/mL)	1588.78	430.88
IL-23(pg/mL)	101.52	180.47
IL-17(pg/mL)	3.9	7.8
Soluble Adhesion Molecules		
sICAM (ng/mL)	393.37	95.74
sVCAM (ng/mL)	516.06	226.94

SD = standard deviation

Artigo 3

Título

Citocinas e Associação com Eventos Clínicos na Anemia Falciforme.

Wendell Vilas Boas, Bruno A. V. Cerqueira, Angela A. D. Zanette, Mitermayer G. Reis, Marilda S. Gonçalves

Publicado na revista *Gazeta Médica da Bahia*, 2010 – 80(3): 53-55

- Este artigo investigou os níveis das citocinas IL-4, IL-17, IL-18, IL-23 e TGF-beta associando com os eventos clínicos presentes na AF. Foi encontrada uma associação na ocorrência de sequestro esplênico e níveis diminuídos da citocina IL-18.

CITOCINAS E ASSOCIAÇÃO COM EVENTOS CLÍNICOS NA ANEMIA FALCIFORME

CYTOKINES AND CLINICAL EVENTS IN THE SICKLE CELL ANEMIA

Wendell Vilas Boas, Bruno A. V. Cerqueira, Angela A. D. Zanette, Mitermayer G. Reis, Marilda S. Gonçalves
 Laboratório de Patologia e Biologia Molecular, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) -
 Salvador, Bahia, Brasil; Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, Bahia, Brasil; Fundação de Hematologia e Hemoterapia
 do Estado da Bahia (HEMOBA), Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Faculdade de Farmácia da Universidade
 Federal da Bahia (UFBA), Salvador, Bahia, Brasil

A expressão de citocinas pode exercer papel fundamental no quadro clínico apresentado por indivíduos com anemia falciforme (AF), uma vez que pode ter efeito sobre o endotélio vascular e na expressão de moléculas de adesão, fenômenos importantes na patogênese da doença. O objetivo deste trabalho foi investigar níveis de citocinas IL-4, IL-17, IL-18, IL-23 e TGF-beta e associações com os eventos clínicos presentes na AF. A casuística foi composta por 51 pacientes com AF e as dosagens de citocinas foram realizadas pelo método de ELISA; os dados clínicos foram coletados por consulta aos prontuários médicos. A análise de correlação mostrou que os pacientes com eventos de sequestro esplênico possuíam níveis diminuídos da citocina IL-18 ($p=0,032$). As demais citocinas não apresentaram diferenças quanto aos eventos clínicos apresentados por esse grupo de pacientes. Os eventos de sequestro esplênico podem influenciar na retirada do baço em pacientes com AF, comprometendo os mecanismos de defesa contra microorganismos, aumentando a susceptibilidade às infecções e, conseqüentemente, influenciando na produção de citocinas.

Palavras-chave: anemia falciforme, citocinas, sequestro esplênico.

The expression of cytokines can develop fundamental role in the clinical characteristics presented by individuals with sickle cell anemia (SCA), since it can affect vascular endothelium and in the adhesion molecules expression, important phenomena in the pathogenesis of the illness. The objective of this work was investigate levels of cytokines IL-4, IL-17, IL-18, IL-23 and TGF-beta, associating with the clinical events presented by SCA patients. Our casuistic was composed by 51 SCA patients and cytokines measurement was carried out by ELISA; clinical data were collected by medical register. The analysis of correlation showed that the patients with splenic sequestration events had decreased levels of the IL-18 ($p=0.032$). The others cytokines did not present differences as regards the clinical events presented by this group of patients. The events of splenic sequestration can influence in the splenectomy in patients with SCA, committing the mechanisms of defense against microorganisms, increasing the sensitivity to the infections and, consequently, influencing in the output of cytokines.

Keywords: Sickle cell anemia, cytokines, splenic sequestration.

A anemia falciforme (AF) é uma doença resultante da homozigose de mutação pontual no sexto códon do gene da *globina-beta*, que leva a substituição de resíduo de ácido glutâmico por valina na proteína⁽⁷⁾. Os portadores dessa anemia possuem quadro clínico heterogêneo, com retardo no crescimento, desenvolvimento e alterações múltiplas nos diversos órgãos ou tecidos (cardíaco, renal, pulmonar, cerebral, esquelético e hepático) provenientes da hemólise contínua e dos fenômenos de vaso-occlusão, além do aumento da susceptibilidade a infecções favorecido pela asplenia funcional que ocorre progressivamente, dificultando a opsonização de bactérias encapsuladas⁽¹¹⁾. A gravidade clínica na AF é bastante variável entre os pacientes, sendo

encontrados indivíduos com gravidade clínica intermediária à grave⁽⁹⁾. A AF é caracterizada por quadro inflamatório crônico, apresentando contagem elevada de leucócitos, ativação anormal de granulócitos, monócitos e células endoteliais e elevação nos níveis de mediadores inflamatórios. A adesão de leucócitos ao endotélio pode, por si só, promover o evento de vaso-occlusão. Esses leucócitos aderentes podem ser responsáveis pela ligação a moléculas na superfície dos eritrócitos e posterior retenção dessas células vermelhas no vaso, sugerindo uma associação direta e indireta no processo vaso-oclusivo⁽¹²⁾.

O endotélio é também adversamente afetado na AF e pode contribuir para a vaso-occlusão. Os danos frequentes ao endotélio pelos eritrócitos falciformes, citocinas e sobrecarga de ferro são fatores que podem ativar o endotélio vascular, comprometendo a integridade do vaso e promovendo tanto adesão de células vermelhas quanto de leucócitos ao endotélio do vaso⁽²⁾. A expressão de citocinas pode ter papel fundamental no quadro clínico apresentado pelos pacientes com AF e os efeitos dessas citocinas sobre o endotélio vascular e expressão de moléculas de adesão têm sido considerado como tema relevante^(3 10).

Recebido em 19/6/2010

Aceito em 9/10/2010

Endereço para correspondência: Profa. Marilda Souza Gonçalves, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, FIOCRUZ. Rua Waldemar Falcão, 121, Candeal, 40296-710 Salvador, Bahia, Brasil. E-mail: mari@bahia.fiocruz.br. Fontes de financiamento: CNPq 3065427/2007-5 e 484457/2007-1; FAPESB 1431040053063 e 9073/2007 e MCD/CNPq/MS-SCTIE-DECIT 409800/2006-6.

Gazeta Médica da Bahia

2010;80:3(Ago-Out):53-55

© 2010 Gazeta Médica da Bahia. Todos os direitos reservados.

Neste trabalho, nós investigamos o papel de citocinas como IL-4, IL-17, IL-18, IL-23 e TGF-beta e sua associação com os principais eventos clínicos presentes nos casos estudados portadores de AF.

Material e Métodos

Casuística

Foram incluídos no estudo, 53 pacientes portadores de anemia falciforme (Hb SS) provenientes da Fundação de Hematologia e Hemoterapia da Bahia – HEMOBA. Todos os pacientes apresentavam estado estável da doença e sem história de terapia transfusional nos últimos seis meses. Este estudo foi aprovado pelo Comitê em Pesquisa com Seres humanos da Fundação Oswaldo Cruz (CAAE 0013.1.225.000-07) e está em acordo com a declaração de Helsinki de 1972. Todos os indivíduos ou seus responsáveis assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido, concordando em participar do estudo.

Quantificação das citocinas

A quantificação das citocinas IL-4, IL-17, IL-18, IL-23 e TGF-beta foi realizada utilizando os *kit* Cytokine ELISA OptEIA para cada citocina (BD Pharmingen, San Diego, CA, USA).

Dados clínicos dos pacientes

A coleta dos dados clínicos foi feita através da consulta dos prontuários médicos dos pacientes.

Análise estatística

A distribuição das variáveis quantitativas foi determinada utilizando o teste Kolmogorov-Smirnov. Os testes ANOVA ou Kruskal-Wal foram utilizados na comparação das médias entre os grupos, para variáveis com distribuição normal ou não, respectivamente. Os valores de *p* foram considerados significativos quando menores que 0,05. Os dados foram analisados utilizando o programa Prism 5.01 (Graphpad Software, San Diego, CA, USA).

Resultados

Eventos clínicos

Entre as complicações clínicas mais frequentemente observadas nos pacientes estavam as crises dolorosas, presentes em 96,1% dos pacientes e as infecções em 56,9%. Os principais eventos clínicos observados nos pacientes com AF estão representados na Tabela 1.

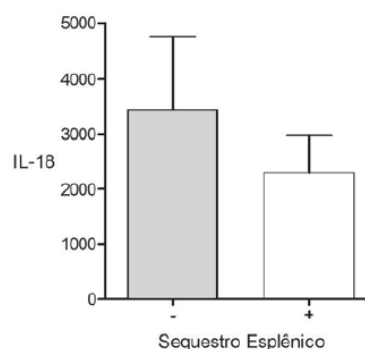
A citocina IL-18 está associada a eventos de sequestro esplênico nos pacientes

A investigação dos níveis de citocinas e sua associação com dados clínicos em pacientes com AF mostrou associação com eventos de sequestro esplênico entre os pacientes com AF ($p=0,032$). A partir desta análise, foi verificado que os pacientes com eventos de sequestro esplênico possuíam níveis diminuídos de IL-18 em comparação com os pacientes que não apresentaram tal evento (Gráfico 1).

Tabela 1. Frequência dos eventos clínicos apresentados nos 51 pacientes estudados com anemia falciforme.

Eventos Clínicos	n (%)
Crises de dor	49 (96,1)
Infecção	29 (56,9)
Pneumonia	18 (35,3)
Úlcera de Perna	13 (25,5)
Colelitíase	10 (19,6)
Sequestro esplênico	9 (17,6)
Síndrome torácica aguda	6 (11,8)
Priapismo	4 (7,8)
Retinopatia	2 (3,9)
Acidente vascular cerebral	2 (3,9)

Gráfico 1. Níveis da citocina IL-18 em pacientes com ausência ou presença do evento de sequestro esplênico.



As análises das citocinas IL-4, IL-17, IL-23 e TGF-beta não apresentaram diferenças na associação com os eventos clínicos observados nos pacientes com AF.

Discussão

O evento de sequestro esplênico é caracterizado pelo aumento no tamanho do baço de forma aguda, níveis diminuídos de hemoglobina e quadro febril, podendo ocorrer em 10 a 30% dos indivíduos com AF, sendo mais comum entre os seis meses a três anos de vida. Esses eventos de forma grave podem progredir rapidamente, levando o indivíduo ao quadro de choque e morte, por isso requer a esplenectomia de urgência na maioria dos casos⁽¹⁾. Os casos deste estudo haviam sido previamente esplenectomizados.

Neste estudo foi observada redução nos níveis da citocina IL-18 nos pacientes com ocorrência do evento de sequestro esplênico. A citocina IL-18 é conhecida pela sua importância na indução ao IFN- γ na presença de IL-12⁽⁹⁾, além de aumentar a produção de citocinas Th2, tais como IL-4, IL-5 e IL-13 em basófilos, células CD4 e NK in vitro⁽⁴⁸⁾.

O baço exerce importante função na defesa do organismo contra infecções e a retirada desse órgão leva ao comprometimento da produção de citocinas Th1⁽¹³⁾ e pode diminuir a capacidade do organismo no combate a certos tipos

de infecções bacterianas como as causadas por *Pneumococcus* sp., *Meningococcus* sp. e *Haemophilus influenza*⁽⁶⁾. Esse defeito na produção das citocinas pela ausência do baço explica o encontro de níveis mais baixos de IL-18 nos pacientes com eventos de sequestro esplênico.

Sendo assim, os indivíduos que sofreram o evento de sequestro esplênico e foram esplenectomizados possuem níveis mais baixos de IL-18 em relação a indivíduos não esplenectomizados. Uma vez que IL-18 é uma citocina importante na resposta Th1, os indivíduos sem a presença do baço podem estar mais susceptíveis às infecções comumente ocorridas nessa doença.

Referências

- Bender MA, Hobbs W. Sickle Cell Disease. In: Pagon RA, Bird TC, Dolan CR, Stephens K, editors. GeneReviews. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2003.
- Chiang EY, Frenette PS. Sickle cell vaso-occlusion. *Hematol Oncol Clin North Am* 19: 771-784, 2005.
- Hebbel RP, Osarogiabon R, Kaul D. The endothelial biology of sickle cell disease: inflammation and a chronic vasculopathy. *Microcirculation* 11: 129-151, 2004.
- Hoshino T, Wiltout RH, Young HA. IL-18 is a potent coinducer of IL-13 in NK and T cells: a new potential role for IL-18 in modulating the immune response. *J Immunol* 162: 5070-5077, 1999.
- Inati A. Recent advances in improving the management of sickle cell disease. *Blood Rev* 23 1: 9-13, 2009.
- Kuranaga N, Kinoshita M, Kawabata T, Shinomiya N, Seki S. A defective Th1 response of the spleen in the initial phase may explain why splenectomy helps prevent a *Listeria* infection. *Clin Exp Immunol* 140: 11-21, 2005.
- Lukens JN. The thalassemia and related disorders: quantitative disorders of hemoglobin synthesis In: Lee CW, Foster J, Lukens J, Paraskevas F, Greer JP, Rodgers GM. *Wintrobe's clinical hematology*. 10ª edição. Baltimore: Williams & Wilkins, cap. 53, p. 1405-1448, 1999.
- Ogura T, Ueda H, Hosohara K. Interleukin-18 stimulates hematopoietic cytokine and growth factor formation and augments the circulating granulocytes in mice. *Blood* 98: 2101-2007,2001.
- Okamura H, Nagata K, Komatsu T. A novel costimulatory factor for gamma interferon induction found in the livers of mice cause endotoxic shock. *Infect Immun* 63: 3966-3972, 1995.
- Okpala I. The intriguing contribution of white blood cells to sickle cell disease- a red cell disorder. *Blood Reviews* 18: 65-73, 2004.
- Roseff SD. Sickle cell disease: a review. *Immunohematology* 25:67-74, 2009.
- Turhan A, Weiss LA, Mohandas N. Primary role for adherent leukocytes in sickle cell vascular occlusion: a new paradigm. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 3047-3051, 2002.
- Wood PR, Young AM, McKimm-Breschkin JL, Cheers C. Effect of splenectomy on production of interferon and colony-stimulating factor in *Listeria* monocytogenes-infected mice. *Infect Immun* 46: 860-861, 1984.

5. DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

Nesta seção são discutidos os resultados dos três artigos que fazem parte desta tese.

Para uma melhor compreensão da fisiopatologia da AF, os eventos que interferem na dinâmica vascular devem ser objetos de estudos que relacionem seus efeitos à patologia da doença, objetivando entender e interferir no processo patológico com a finalidade de se entender melhor os mecanismos de vaso-oclusão presentes na doença.

Os resultados encontrados no nosso primeiro artigo indicam a importância da via do metabolismo do NO na contribuição da fisiopatologia da AF quando demonstrada a concentração sérica elevada da arginase nos indivíduos com AF em comparação com indivíduos saudáveis. A arginase cataliza a hidrólise da arginina em ornitina e uréia (IYAMU *et al.*, 2005),

Morris e cols. (2005) investigaram a atividade da arginase nos eritrócitos e no plasma de indivíduos com AF, que se encontraram elevadas em relação às determinações realizadas nos indivíduos do grupo controle. No nosso estudo foram determinados os níveis plasmáticos dessa enzima, mas não a sua atividade. Porém, apesar de não ter sido realizada a quantificação dos níveis plasmáticos de arginina é presumível que a concentração elevada de arginase esteja consumindo a arginina presente no sangue desses pacientes, diminuindo consideravelmente as suas taxas.

O entendimento do metabolismo do NO na AF é importante para a compreensão dos mecanismos envolvidos na fisiopatologia da vasculopatia na AF. Levando em consideração o papel crucial do NO na resposta vasodilatadora e antiinflamatória dos vasos sanguíneos, não é difícil associar o papel da regulação da via do NO às implicações de suas alterações na AF.

A arginase presente no interior dos eritrócitos é a que contribui para a elevação dessa enzima na circulação, uma vez que a elevação dos níveis da arginase está positivamente relacionada com os marcadores de hemólise (bilirrubinas e AST).

É importante distinguir a origem dessa arginase, uma vez que é uma enzima intracelular que está presente não só nos eritrócitos, mas também no fígado e rins e só se apresenta no plasma após algum dano celular, assim como pode ser induzida por uma variedade de citocinas (KIM *et al.*, 2002). A associação dos níveis de arginase aos marcadores de inflamação pode ser esperada, uma vez que a arginase, em algumas vias, como em macrófagos, pode ser induzida pela resposta à citocinas produzidas pelos linfócitos Th2 e mediadores inflamatórios que estão alterados na AF, tais como respostas ao lipopolissacarídeo bacteriano (LPS), IL-4, IL-10, IL-13, TGF-beta, glucocorticóides, análogos de cAMP, assim como a hipóxia e trauma (MORRIS, 2002). A regulação da arginase em células inflamatórias em resposta a estímulos pode ser encontrada em diversos estudos (MILLS *et al.*, 2000; WALLACE *et al.*, 2008). No entanto, é desconhecido se existe a participação direta da regulação desta enzima em resposta à hemólise e inflamação presentes na AF.

Neste trabalho também foram investigadas citocinas relacionadas à resposta Th17, como IL-23, IL-17 e TGF-beta. De maneira interessante, foi encontrada correlação positiva entre a arginase plasmática e o TGF-beta nos indivíduos com AF. Entretanto, não existem dados na literatura que demonstrem esta associação na AF. A respeito das vias do metabolismo do NO/arginase na resposta inflamatória podemos sugerir a ligação na indução da via da arginase com o TGF-beta. Durante o processo de cicatrização, os macrófagos produzem pouco NO/citrulina, mas ao invés disso, metabolizam a arginina primariamente pela via da ornitina/uréia utilizando a enzima arginase. Esse padrão do metabolismo da arginina faz sentido no processo reconstrutivo dos tecidos, uma vez que o excesso de NO iria

inibir a replicação celular e a cicatrização, enquanto que a ornitina promoveria a replicação e o reparo, por ser precursor para poliaminas e colágeno (NATHAN & HIBBS, 1991; WU e MORRIS, 1998). Nesse sentido, as concentrações elevadas de arginase exibidas pelos pacientes com AF estudados podem colaborar para o crescimento celular do músculo liso e deposição de colágeno, promovendo o remodelamento aberrante da parede do vaso.

O TGF-beta tem papel fundamental na modulação de macrófago de forma mais citotóxica para o fenótipo menos ativado (LI *et al.*, 2006). Uma consequência especialmente importante para essa mudança é a habilidade do TGF-beta em estimular a produção de arginase nos macrófagos, e por outro lado, induzir a redução na produção de NO (MILLS *et al.*, 2000). Mostrando que existe ligação entre níveis de TGF-beta e arginase, não somente na resposta inflamatória, mas também em implicações no metabolismo do NO na AF. Os resultados deste trabalho foram análise de correlação, não sendo possível descrever ao certo as vias nas quais uma molécula determina a indução de outra. Por esse motivo, trabalhos experimentais, relacionados à via arginase/TGF-beta colaborarão para o entendimento destes processos, bem como de outros fatores envolvidos na mudança do metabolismo pelo uso da arginina, no sentido via produção de NO ou via ornitina/uréia.

As concentrações plasmáticas de moléculas de adesão solúveis refletem a expressão da ativação dessas moléculas pelo endotélio vascular e pelas células e podem representar a ativação endotelial. As moléculas de adesão sVCAM-1 e sICAM-1 avaliadas no presente estudo foram associadas, positivamente, aos marcadores de hemólise AST, LDH e a contagem de reticulócito, mostrando a contribuição do quadro hemolítico do paciente com AF na ativação endotelial. Outros trabalhos também mostraram a relação de marcadores de hemólise, principalmente da LDH, com a expressão de moléculas de adesão (SCHNOG *et al.*, 2003; KATO *et al.*, 2006b). As moléculas de adesão VCAM-1 e ICAM-1 são normalmente expressas em níveis diminuídos na superfície das células endoteliais com expressão induzida

por uma variedade de estímulos biológicos, particularmente por citocinas inflamatórias, tais como, IL-1 e TNF-alfa. Essas moléculas proporcionam uma superfície adesiva para ligantes de superfícies dos leucócitos recrutados como parte da resposta inflamatória (KATO *et al.*, 2005).

O processo de hemólise contribui para a diminuição do NO e conseqüentemente provoca alterações no metabolismo da arginina/NO. A Hb no interior do eritrócito, em condições normais, dificulta a reação com o NO do vaso, porém durante episódios de hemólise intravascular, a Hb liberada diretamente no plasma reage rapidamente e depleta o NO, resultando no seu consumo elevado e rápido e na geração de ROS, inibindo a vasodilatação. A redução de NO pelos produtos gerados no vaso causa também danos endoteliais via ativação transcricional de moléculas de adesão e moléculas vasoconstrictoras como a endotelina-1 (ROTHER *et al.*, 2005). A liberação simultânea da arginase pelo eritrócito durante a hemólise se torna outro fator limitante na disponibilidade da arginina para a síntese do NO, contribuindo ainda mais para a sua deficiência na AF.

Neste trabalho não foram demonstradas associações entre os níveis de arginase plasmática e as moléculas de adesão solúveis (sVCAM-1 e sICAM-1) nos pacientes com AF. Isto pode ser devido a forma indireta de ação da arginase na indução da expressão das moléculas de adesão, pois é sabido que a ativação vascular, representada pela expressão das moléculas de adesão, ocorre tanto pelo estado de resistência do NO nos vasos como também em resposta ao estresse oxidativo. No entanto, Morris e colaboradores (2005) descreveram a associação da atividade da arginase e VCAM-1 em 140 pacientes com AF.

A heterogeneidade clínica na AF é marcante, uma vez que a mutação de ponto associada à HbS, por si só não explica toda a variabilidade fenotípica apresentada pelos pacientes. Desta forma, é cada vez maior a busca por fatores prognósticos que modulem a heterogeneidade clínica presente na AF. A literatura possui poucos trabalhos avaliando o

papel das citocinas relacionadas às células Th17 e a sua influência na AF. Neste trabalho foi demonstrada associação entre o TGF-beta e os níveis de arginase plasmáticos, questões ainda não descritas para a AF. Ressaltamos que se levarmos em consideração o perfil inflamatório alterado exibido por esses pacientes, alguns mecanismos são ainda desconhecidos e precisam ser elucidados.

O segundo artigo desta tese teve como foco principal o estudo da homocisteína (Hcy) nos pacientes com AF. Essa escolha foi baseada na associação das concentrações plasmáticas elevadas desse aminoácido, ou seja, da hiperhomocisteinemia, a alterações vasculares. As concentrações plasmáticas elevadas de Hcy é um fator de risco bem estabelecido para diversas doenças, incluindo doenças cardiovasculares, acidente vascular cerebral (AVC), trombose venosa e arteriosclerose (REFSUM *et al.*, 1998; BIALECKA *et al.*, 2009).

No presente estudo o valor médio para a concentração de Hcy foi de 7,3 umol/L semelhante ao valor de 7,4 umol/L descrito por Couto e colaboradores (2007) ao estudarem neonatos da mesma população. Também não se encontrou diferenças entre as concentrações plasmáticas de Hcy nos pacientes com AF. Porém, a Hcy foi associada com marcadores de inflamação e de ativação endotelial, fato que sugere que essa molécula pode exercer fator de risco vascular adicional nessa doença.

Alguns trabalhos têm estudado as concentrações de Hcy plasmática nos indivíduos com AF: Lowenthal e colaboradores (2000) descreveram que a concentração plasmática de Hcy em indivíduos com AF dos EUA era 1,5 vezes mais elevada que a descrita para o grupo controle; Dhar e colaboradores (2004) também demonstraram diferenças entre as concentrações de Hcy em pacientes americanos com AF e controles (9,7 vs 8,5 umol/L); no entanto, Al-Absi e colaboradores (2006) não encontraram diferenças entre os indivíduos com AF e controles do Oriente Médio, assim como Balasa e colaboradores (1999) que encontraram níveis dentro dos limites de normalidade e similares entre casos e controles (5,8

vs 5,4 umol/L). Entretanto, os trabalhos citados não realizaram a associação da Hcy com moléculas relacionadas à ativação vascular ou inflamação. Com base nesses dados, concluiu-se que existem variações nas concentrações de Hcy em diferentes populações de pacientes com AF, provavelmente, devido a influências culturais, alimentares e também genéticas particulares de cada grupo, uma vez que polimorfismos nos genes responsáveis pela síntese de metabolitos dos folatos podem alterar as concentrações de Hcy plasmáticas.

Diversos mecanismos têm sido propostos para as alterações vasculares presentes na AF pela ação da Hcy, tais como a atividade citotóxica, especialmente em células endoteliais, com elevação do peróxido de hidrogênio e diminuição do NO; a indução da expressão de citocinas, ativação de fatores pró-coagulantes, modificação oxidativa na lipoproteína de baixa densidade (LDL) e alterações na cascata de coagulação, como diminuição de antitrombina III e aumento do fator VII e da proteína C (LAWRENCE DE KONING *et al.*, 2003; BIALECKA *et al.*, 2009).

Diante das hipóteses referentes aos danos vasculares causados pela Hcy, foram analisadas moléculas relacionadas à inflamação e ativação endotelial, tais como moléculas de adesão solúveis e citocinas relacionadas à resposta Th17, tais como a IL-18, IL-23, IL-17 e TGF-beta nos pacientes com AF associando-as aos níveis de Hcy.

No conjunto de citocinas avaliadas demonstrou-se que os níveis de IL-17 nos indivíduos com AF são mais elevados que nos controles. A IL-17, pela sua ação inflamatória, pode representar um novo marcador de inflamação crônica na AF, que está sempre associada às alterações no perfil de citocinas presente apresentados por esses pacientes. Esta hipótese foi formulada, uma vez que não existem trabalhos relatando resultados semelhantes.

A IL-17 e o TGF-beta foram positivamente correlacionados aos níveis de Hcy nos pacientes com AF. Isto pode estar ligado à ação da Hcy em induzir a expressão de citocinas pró-inflamatórias, como referido por Poddar e colaboradores (2001), que observaram o

aumento na expressão e secreção de IL-8 e da proteína quimioatraente de monócitos (MCP-1) pelo endotélio vascular induzido por Hcy. Outro trabalho mostra também a adesão aumentada de monócitos e células T ao endotélio (KOGA *et al.*, 2002).

Mais recentemente, foi descrito que a Hcy, mesmo em concentrações fisiológicas, aumenta a proliferação de monócitos e, também induz a expressão em monócitos, de citocinas pró-inflamatórias como TNF-alfa, IL-1b, IL-6, IL-8 e IL-12 (SU *et al.*, 2005). A correlação positiva entre a Hcy e as citocinas IL-17 e TGF-beta pode sugerir que a expressão destas citocinas pode ter relação com os níveis de Hcy nos indivíduos com AF. O TGF-beta é uma citocina que pode exercer tanto ação antiinflamatória como proinflamatória, dependendo da quantidade produzida e do local de expressão, sendo que em combinação com outras citocinas, como o IL-6, durante a resposta imune inata, pode promover a diferenciação de subtipos de células proinflamatórias CD4⁺ que secretam IL-17 (ABBAS, 2007). A citocina TGF-beta está relacionada com diversas doenças, incluindo doenças cardiovasculares (RODRIGUEZ-VITA *et al.*, 2008), sendo assim a elevação dos níveis de IL-17 podem estar relacionados com as concentrações do TGF-beta.

Em referência à ativação vascular, os níveis de Hcy também se mostraram positivamente relacionados com a concentração de VCAM solúvel nos pacientes. A VCAM solúvel foi quantificada no soro dos pacientes e, quando aumentada está associada a ativação endotelial e a expressão de VCAM pelo endotélio vascular. A VCAM tem expressão basal baixa no endotélio vascular e proporciona a adesão firme aos leucócitos circulantes, e sua expressão pode ser aumentada por citocinas inflamatórias como IL-1 β e TNF- α . O aumento na expressão da VCAM solúvel pode ter efeito na elevação das concentrações de Hcy nos pacientes com AF estudados; (LIN *et al.*, 2008) demonstraram a elevação na expressão endotelial de VCAM com o estímulo da Hcy e, conseqüentemente, adesão maior de monócitos ao endotélio. Uma vez que, no presente estudo, foi descrita somente a associação,

não se pode afirmar que a Hcy estimula a produção de VCAM, porém, tomando como base o resultado obtido por Lin e colaboradores (2008) relativo ao efeito direto da Hcy na expressão da molécula VCAM nos pacientes com AF. Esse mecanismo pode ser relevante, uma vez que pode contribuir para desencadear a vaso-oclusão na AF, principalmente à adesão de leucócitos ao endotélio vascular em resposta ao estado inflamatório crônico presente na doença.

Uma vez que pacientes com AF possuem episódios vaso-oclusivos frequentes ocasionados por diversos fatores, sugere-se com base nos resultados e dados da literatura, que a Hcy possa atuar como fator adicional que contribui para a alteração e ativação vascular e para a expressão de citocinas inflamatórias. As vias de ativação endotelial e expressão de citocinas pela Hcy ainda não estão esclarecidas, sendo necessária a realização de estudos futuros que serão de importância para o monitoramento clínico e a utilização de terapias mais específicas nesses pacientes.

O terceiro estudo incluído nesta tese diz respeito à relação da história clínica dos pacientes com AF e a expressão de citocinas. O quadro inflamatório presente na AF desempenha papel significativo nas manifestações clínicas apresentadas por esses pacientes. O balanço entre o estado estável e o de crise nos pacientes é delicado e a presença de fatores que alteram o grau de ativação endotelial e adesividade das células ao endotélio podem, potencialmente, precipitar episódios vaso-oclusivos e de crises dolorosas (HAYNES e OBIAKO, 2002). As citocinas estão envolvidas na patogênese dos fenômenos vaso-oclusivos por diversos mecanismos, tais como a ativação endotelial; a adesão de células ao endotélio vascular; o desenvolvimento de hiperplasia vascular; a ativação de plaquetas; a produção de endotelina e disfunção na apoptose (MAKIS *et al.*, 2000).

É muito difícil associar os eventos clínicos presentes na AF diretamente a um fator específico, como por exemplo, a produção de citocinas, uma vez que a heterogeneidade

clínica e a complexidade desses eventos podem interferir nesta associação. Porém, neste estudo, foi investigada a história clínica de 53 pacientes com AF e realizada a análise de associação com as concentrações de citocinas relacionadas às células Th17, além da IL-4 e IL-18. O encontro de níveis diminuídos da citocina IL-18 nos pacientes esplenectomizados pode representar uma deficiência na produção desta citocina pela retirada do baço e o comprometimento na defesa do organismo contra infecções. Nenhuma citocina relacionada as células Th17 foi diretamente associada aos eventos clínicos. Os episódios subclínicos de vaso-oclusão também podem ocorrer, porém não são detectados como eventos clínicos fenotipicamente caracterizados (MAKIS *et al.*, 2000).

Sendo assim, os principais resultados desta tese sugerem um papel da homocisteína na indução da ativação celular, pela correlação com o sVCAM, e na expressão da citocina TGF-beta. A elevação do TGF-beta pode estar relacionada com a indução na expressão de IL-17, a qual se encontra mais elevada nos pacientes com anemia falciforme. Além disso, o TGF-beta foi correlacionado com níveis elevados de arginase plasmática nos pacientes, sugerindo um papel desta citocina na expressão da arginase e sugerindo uma maior depleção da arginina e diminuição na formação de NO e contribuindo para a disfunção endotelial nos pacientes com anemia falciforme.

6. CONCLUSÕES

6. CONCLUSÕES

- A concentração da enzima arginase no soro de pacientes com AF está elevada quando comparada a apresentada por indivíduos controles, podendo estar associada com a ativação endotelial;
- A elevação da arginase nos pacientes com AF sugere uma associação aos episódios hemolíticos, pela correlação com os níveis de bilirrubinas e AST, sugerindo uma atuação nos mecanismos de hemólise;
- O TGF-beta foi positivamente correlacionado com a arginase sérica, sugerindo um papel dessa citocina na via da arginase;
- IL-17 e TGF-beta também estão associados à elevação da Hcy nos pacientes com AF, o que pode indicar participação na ativação endotelial;
- O quadro hemolítico apresentado pelos pacientes com AF esteve associado a elevação na concentração de moléculas de adesão solúvel, como a VCAM-1;
- Os indivíduos com AF da população estudada não possuem níveis elevados de Hcy, apesar desta molécula ter apresentado correlação positiva com a VCAM-1 solúvel, podendo estar associada à ativação endotelial;
- Os pacientes com AF possuem níveis mais elevados da IL-17 quando comparados aos indivíduos saudáveis, podendo representar um dos mecanismos na inflamação crônica nesses pacientes;
- A IL-18 encontra-se em concentrações mais baixas nos indivíduos com AF esplenectomizados, sugerindo um papel desta citocina na resposta a infecção.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abbas, A. K. e A. H. Lichtman. Imunologia Celular e Molecular. Rio de Janeiro: Elsevier. 2007
- Al-Absi, I. K., A. M. Al-Subaie, G. Ameen, N. Mahdi, A. M. Mohammad, N. A. Fawaz e W. Y. Almawi. Association of the methylenetetrahydrofolate reductase A1298C but not the C677T single nucleotide polymorphism with sickle cell disease in Bahrain. *Hemoglobin*, v.30, n.4, p.449-53. 2006.
- Alexander, N., D. Higgs, G. Dover e G. R. Serjeant. Are there clinical phenotypes of homozygous sickle cell disease? *Br J Haematol*, v.126, n.4, Aug, p.606-11. 2004.
- Alon, R. e S. Feigelson. From rolling to arrest on blood vessels: leukocyte tap dancing on endothelial integrin ligands and chemokines at sub-second contacts. *Semin Immunol*, v.14, n.2, Apr, p.93-104. 2002.
- Alon, R., P. D. Kassner, M. W. Carr, E. B. Finger, M. E. Hemler e T. A. Springer. The integrin VLA-4 supports tethering and rolling in flow on VCAM-1. *J Cell Biol*, v.128, n.6, Mar, p.1243-53. 1995.
- Aslan, M. e B. A. Freeman. Oxidant-mediated impairment of nitric oxide signaling in sickle cell disease--mechanisms and consequences. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*, v.50, n.1, Feb, p.95-105. 2004.
- Aslan, M., D. Thornley-Brown e B. A. Freeman. Reactive species in sickle cell disease. *Ann N Y Acad Sci*, v.899, p.375-91. 2000.
- Assis, A., N. Conran, A. A. Canalli, I. Lorand-Metze, S. T. Saad e F. F. Costa. Effect of cytokines and chemokines on sickle neutrophil adhesion to fibronectin. *Acta Haematol*, v.113, n.2, p.130-6. 2005.
- Balasa, V. V., R. A. Gruppo, P. S. Gartside e K. A. Kalinyak. Correlation of the C677T MTHFR genotype with homocysteine levels in children with sickle cell disease. *J Pediatr Hematol Oncol*, v.21, n.5, Sep-Oct, p.397-400. 1999.
- Benkerrou, M., C. Delarche, L. Brahimi, M. Fay, E. Vilmer, J. Elion, M. A. Gougerot-Pocidaló e C. Elbim. Hydroxyurea corrects the dysregulated L-selectin expression and increased H(2)O(2) production of polymorphonuclear neutrophils from patients with sickle cell anemia. *Blood*, v.99, n.7, Apr 1, p.2297-303. 2002.
- Bennett, J. S. Vasoocclusion in sickle cell anemia: are platelets really involved? *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, v.26, n.7, Jul, p.1415-6. 2006.
- Bialecka, M., P. Robowski, K. Honczarenko, A. Roszmann e J. Slawek. Genetic and environmental factors for hyperhomocysteinaemia and its clinical implications in Parkinson's disease. *Neurol Neurochir Pol*, v.43, n.3, May-Jun, p.272-85. 2009.
- Brittenham, G. M., A. N. Schechter e C. T. Noguchi. Hemoglobin S polymerization: primary determinant of the hemolytic and clinical severity of the sickling syndromes. *Blood*, v.65, n.1, Jan, p.183-9. 1985.
- Bunn, H. F. Pathogenesis and treatment of sickle cell disease. *N Engl J Med*, v.337, n.11, Sep 11, p.762-9. 1997.

Bunn, H. F., D. G. Nathan, G. J. Dover, R. P. Hebbel, O. S. Platt, W. F. Rosse e R. E. Ware. Pulmonary hypertension and nitric oxide depletion in sickle cell disease. *Blood*, v.116, n.5, Aug 5, p.687-92. 2010.

Clarke, R., L. Daly, K. Robinson, E. Naughten, S. Cahalane, B. Fowler e I. Graham. Hyperhomocysteinemia: an independent risk factor for vascular disease. *N Engl J Med*, v.324, n.17, Apr 25, p.1149-55. 1991.

Conran, N. e F. F. Costa. Hemoglobin disorders and endothelial cell interactions. *Clin Biochem*, v.42, n.18, Dec, p.1824-38. 2009.

Couto, F. D., L. M. Moreira, D. B. Dos Santos, M. G. Reis e M. S. Goncalves. Folate, vitamin B12 and total homocysteine levels in neonates from Brazil. *Eur J Clin Nutr*, v.61, n.3, Mar, p.382-6. 2007.

Dhar, M., R. Bellevue, S. Brar e R. Carmel. Mild hyperhomocysteinemia in adult patients with sickle cell disease: a common finding unrelated to folate and cobalamin status. *Am J Hematol*, v.76, n.2, Jun, p.114-20. 2004.

Diwan, B. A., M. T. Gladwin, C. T. Noguchi, J. M. Ward, A. L. Fitzhugh e G. S. Buzard. Renal pathology in hemizygous sickle cell mice. *Toxicol Pathol*, v.30, n.2, Mar-Apr, p.254-62. 2002.

Droge, W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev*, v.82, n.1, Jan, p.47-95. 2002.

Eberhardt, R. T., M. A. Forgione, A. Cap, J. A. Leopold, M. A. Rudd, M. Trollet, S. Heydrick, R. Stark, E. S. Klings, N. I. Moldovan, M. Yaghoubi, P. J. Goldschmidt-Clermont, H. W. Farber, R. Cohen e J. Loscalzo. Endothelial dysfunction in a murine model of mild hyperhomocyst(e)inemia. *J Clin Invest*, v.106, n.4, Aug, p.483-91. 2000.

Ferreira, R. P., C. F. Franco-Penteado, S. T. O. Saad, F. F. Costa e N. Conran. Platelets from sickle cell disease individuals demonstrate increased adhesive properties that are reversed by hydroxyurea therapy in association with alterations in intraplatelet cAMP and GPIIb/IIIa integrin activation. *Blood*, v.112, p.2472. 2008.

Frenette, P. S. e G. F. Atweh. Sickle cell disease: old discoveries, new concepts, and future promise. *J Clin Invest*, v.117, n.4, Apr, p.850-8. 2007.

Galley, H. F. e N. R. Webster. Physiology of the endothelium. *Br J Anaesth*, v.93, n.1, Jul, p.105-13. 2004.

Gladwin, M. T., V. Sachdev, M. L. Jison, Y. Shizukuda, J. F. Plehn, K. Minter, B. Brown, W. A. Coles, J. S. Nichols, I. Ernst, L. A. Hunter, W. C. Blackwelder, A. N. Schechter, G. P. Rodgers, O. Castro e F. P. Ognibene. Pulmonary hypertension as a risk factor for death in patients with sickle cell disease. *N Engl J Med*, v.350, n.9, Feb 26, p.886-95. 2004.

Gladwin, M. T. e E. Vichinsky. Pulmonary complications of sickle cell disease. *N Engl J Med*, v.359, n.21, Nov 20, p.2254-65. 2008.

Hartge, M. M., T. Unger e U. Kintscher. The endothelium and vascular inflammation in diabetes. *Diab Vasc Dis Res*, v.4, n.2, Jun, p.84-8. 2007.

Haynes, J., Jr. e B. Obiako. Activated polymorphonuclear cells increase sickle red blood cell retention in lung: role of phospholipids. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, v.282, n.1, Jan, p.H122-30. 2002.

Ignarro, L. J., R. E. Byrns, G. M. Buga e K. S. Wood. Endothelium-derived relaxing factor from pulmonary artery and vein possesses pharmacologic and chemical properties identical to those of nitric oxide radical. *Circ Res*, v.61, n.6, Dec, p.866-79. 1987.

Iwakura, Y., S. Nakae, S. Saijo e H. Ishigame. The roles of IL-17A in inflammatory immune responses and host defense against pathogens. *Immunol Rev*, v.226, Dec, p.57-79. 2008.

Iyamu, E. W., R. Cecil, L. Parkin, G. Woods, K. Ohene-Frempong e T. Asakura. Modulation of erythrocyte arginase activity in sickle cell disease patients during hydroxyurea therapy. *Br J Haematol*, v.131, n.3, Nov, p.389-94. 2005.

Kato, G. J., M. T. Gladwin e M. H. Steinberg. Deconstructing sickle cell disease: reappraisal of the role of hemolysis in the development of clinical subphenotypes. *Blood Rev*, v.21, n.1, Jan, p.37-47. 2007.

Kato, G. J., M. Hsieh, R. Machado, J. T. Taylor, J. Little, J. A. Butman, T. Lehky, J. Tisdale e M. T. Gladwin. Cerebrovascular disease associated with sickle cell pulmonary hypertension. *Am J Hematol*, v.81, n.7, Jul, p.503-10. 2006a.

Kato, G. J., S. Martyr, W. C. Blackwelder, J. S. Nichols, W. A. Coles, L. A. Hunter, M. L. Brennan, S. L. Hazen e M. T. Gladwin. Levels of soluble endothelium-derived adhesion molecules in patients with sickle cell disease are associated with pulmonary hypertension, organ dysfunction, and mortality. *Br J Haematol*, v.130, n.6, Sep, p.943-53. 2005.

Kato, G. J., V. McGowan, R. F. Machado, J. A. Little, J. T. Taylor, C. R. Morris, J. S. Nichols, X. Wang, M. Poljakovic, S. M. Morris, Jr. e M. T. Gladwin. Lactate dehydrogenase as a biomarker of hemolysis-associated nitric oxide resistance, priapism, leg ulceration, pulmonary hypertension, and death in patients with sickle cell disease. *Blood*, v.107, n.6, Mar 15, p.2279-85. 2006b.

Kaul, D. K., X. D. Liu, H. Y. Chang, R. L. Nagel e M. E. Fabry. Effect of fetal hemoglobin on microvascular regulation in sickle transgenic-knockout mice. *J Clin Invest*, v.114, n.8, Oct, p.1136-45. 2004.

Kim, P. S., R. K. Iyer, K. V. Lu, H. Yu, A. Karimi, R. M. Kern, D. K. Tai, S. D. Cederbaum e W. W. Grody. Expression of the liver form of arginase in erythrocytes. *Mol Genet Metab*, v.76, n.2, Jun, p.100-10. 2002.

Koga, T., K. Claycombe e M. Meydani. Homocysteine increases monocyte and T-cell adhesion to human aortic endothelial cells. *Atherosclerosis*, v.161, n.2, Apr, p.365-74. 2002.

Lawrence De Koning, A. B., G. H. Werstuck, J. Zhou e R. C. Austin. Hyperhomocysteinemia and its role in the development of atherosclerosis. *Clin Biochem*, v.36, n.6, Sep, p.431-41. 2003.

Li, M. O., Y. Y. Wan, S. Sanjabi, A. K. Robertson e R. A. Flavell. Transforming growth factor-beta regulation of immune responses. *Annu Rev Immunol*, v.24, p.99-146. 2006.

Lin, C. P., Y. H. Chen, W. T. Lin, H. B. Leu, T. Z. Liu, S. L. Huang e J. W. Chen. Direct effect of statins on homocysteine-induced endothelial adhesiveness: potential impact to human atherosclerosis. *Eur J Clin Invest*, v.38, n.2, Feb, p.106-16. 2008.

Lowenthal, E. A., M. S. Mayo, P. E. Cornwell e D. Thornley-Brown. Homocysteine elevation in sickle cell disease. *J Am Coll Nutr*, v.19, n.5, Oct, p.608-12. 2000.

- Mack, A. K. e G. J. Kato. Sick cell disease and nitric oxide: a paradigm shift? *Int J Biochem Cell Biol*, v.38, n.8, p.1237-43. 2006.
- Makis, A. C., E. C. Hatzimichael e K. L. Bourantas. The role of cytokines in sickle cell disease. *Ann Hematol*, v.79, n.8, Aug, p.407-13. 2000.
- Mills, C. D., K. Kincaid, J. M. Alt, M. J. Heilman e A. M. Hill. M-1/M-2 macrophages and the Th1/Th2 paradigm. *J Immunol*, v.164, n.12, Jun 15, p.6166-73. 2000.
- Morris, C. R., G. J. Kato, M. Poljakovic, X. Wang, W. C. Blackwelder, V. Sachdev, S. L. Hazen, E. P. Vichinsky, S. M. Morris, Jr. e M. T. Gladwin. Dysregulated arginine metabolism, hemolysis-associated pulmonary hypertension, and mortality in sickle cell disease. *Jama*, v.294, n.1, Jul 6, p.81-90. 2005.
- Morris, C. R., F. A. Kuypers, S. Larkin, N. Sweeters, J. Simon, E. P. Vichinsky e L. A. Styles. Arginine therapy: a novel strategy to induce nitric oxide production in sickle cell disease. *Br J Haematol*, v.111, n.2, Nov, p.498-500. 2000a.
- Morris, C. R., F. A. Kuypers, S. Larkin, E. P. Vichinsky e L. A. Styles. Patterns of arginine and nitric oxide in patients with sickle cell disease with vaso-occlusive crisis and acute chest syndrome. *J Pediatr Hematol Oncol*, v.22, n.6, Nov-Dec, p.515-20. 2000b.
- Morris, S. M., Jr. Regulation of enzymes of the urea cycle and arginine metabolism. *Annu Rev Nutr*, v.22, p.87-105. 2002.
- Musa, B. O., G. C. Onyemelukwe, J. O. Hambolu, A. I. Mamman e A. H. Isa. Pattern of serum cytokine expression and T-cell subsets in sickle cell disease patients in vaso-occlusive crisis. *Clin Vaccine Immunol*, v.17, n.4, Apr, p.602-8. 2010.
- Nathan, C. F. e J. B. Hibbs, Jr. Role of nitric oxide synthesis in macrophage antimicrobial activity. *Curr Opin Immunol*, v.3, n.1, Feb, p.65-70. 1991.
- Nebor, D., M. C. Durpes, D. Mouganel, M. Mukisi-Mukaza, J. Elion, M. D. Hardy-Dessources e M. Romana. Association between Duffy antigen receptor for chemokines expression and levels of inflammation markers in sickle cell anemia patients. *Clin Immunol*, v.136, n.1, Jul, p.116-22. 2010.
- Neidlinger, N. A., S. K. Larkin, A. Bhagat, G. P. Victorino e F. A. Kuypers. Hydrolysis of phosphatidylserine-exposing red blood cells by secretory phospholipase A2 generates lysophosphatidic acid and results in vascular dysfunction. *J Biol Chem*, v.281, n.2, Jan 13, p.775-81. 2006.
- Olson, J. S., E. W. Foley, C. Rogge, A. L. Tsai, M. P. Doyle e D. D. Lemon. No scavenging and the hypertensive effect of hemoglobin-based blood substitutes. *Free Radic Biol Med*, v.36, n.6, Mar 15, p.685-97. 2004.
- Palmer, R. M., A. G. Ferrige e S. Moncada. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature*, v.327, n.6122, Jun 11-17, p.524-6. 1987.
- Pathare, A., S. Al Kindi, A. A. Alnaqdy, S. Daar, H. Knox-Macaulay e D. Dennison. Cytokine profile of sickle cell disease in Oman. *Am J Hematol*, v.77, n.4, Dec, p.323-8. 2004.
- Platt, O. S., B. D. Thorington, D. J. Brambilla, P. F. Milner, W. F. Rosse, E. Vichinsky e T. R. Kinney. Pain in sickle cell disease. Rates and risk factors. *N Engl J Med*, v.325, n.1, Jul 4, p.11-6. 1991.

- Poddar, R., N. Sivasubramanian, P. M. Dibello, K. Robinson e D. W. Jacobsen. Homocysteine induces expression and secretion of monocyte chemoattractant protein-1 and interleukin-8 in human aortic endothelial cells: implications for vascular disease. *Circulation*, v.103, n.22, Jun 5, p.2717-23. 2001.
- Rees, D. C., T. N. Williams e M. T. Gladwin. Sickle-cell disease. *Lancet*, v.376, n.9757, Dec 11, p.2018-31. 2010.
- Refsum, H., P. M. Ueland, O. Nygard e S. E. Vollset. Homocysteine and cardiovascular disease. *Annu Rev Med*, v.49, p.31-62. 1998.
- Reiter, C. D., X. Wang, J. E. Tanus-Santos, N. Hogg, R. O. Cannon, 3rd, A. N. Schechter e M. T. Gladwin. Cell-free hemoglobin limits nitric oxide bioavailability in sickle-cell disease. *Nat Med*, v.8, n.12, Dec, p.1383-9. 2002.
- Rodriguez-Vita, J., E. Sanchez-Galan, B. Santamaria, E. Sanchez-Lopez, R. Rodrigues-Diez, L. M. Blanco-Colio, J. Egido, A. Ortiz e M. Ruiz-Ortega. Essential role of TGF-beta/Smad pathway on statin dependent vascular smooth muscle cell regulation. *PLoS One*, v.3, n.12, p.e3959. 2008.
- Rother, R. P., L. Bell, P. Hillmen e M. T. Gladwin. The clinical sequelae of intravascular hemolysis and extracellular plasma hemoglobin: a novel mechanism of human disease. *Jama*, v.293, n.13, Apr 6, p.1653-62. 2005.
- Sans, E., E. Delachanal e A. Duperray. Analysis of the roles of ICAM-1 in neutrophil transmigration using a reconstituted mammalian cell expression model: implication of ICAM-1 cytoplasmic domain and Rho-dependent signaling pathway. *J Immunol*, v.166, n.1, Jan 1, p.544-51. 2001.
- Schaer, D. J., A. I. Alayash e P. W. Buehler. Gating the radical hemoglobin to macrophages: the anti-inflammatory role of CD163, a scavenger receptor. *Antioxid Redox Signal*, v.9, n.7, Jul, p.991-9. 2007.
- Schechter, A. N. e M. T. Gladwin. Hemoglobin and the paracrine and endocrine functions of nitric oxide. *N Engl J Med*, v.348, n.15, Apr 10, p.1483-5. 2003.
- Schnog, J. B., R. A. Rojer, M. R. Mac Gillavry, H. Ten Cate, D. P. Brandjes e A. J. Duits. Steady-state sVCAM-1 serum levels in adults with sickle cell disease. *Ann Hematol*, v.82, n.2, Feb, p.109-13. 2003.
- Segel, G. B., M. W. Halterman e M. A. Lichtman. The paradox of the neutrophil's role in tissue injury. *J Leukoc Biol*, v.89, n.3, Mar, p.359-72. 2010.
- Silva, W. S., A. Lastra, S. F. Oliveira, N. Klautau-Guimarães e C. K. Grisolia. Avaliação da cobertura do programa de triagem neonatal de hemoglobinopatias em populações do Recôncavo Baiano, Brasil. *Cad. Saúde Pública*, v.22, p.2561-2566. 2006.
- Stuart, M. J. e R. L. Nagel. Sickle-cell disease. *Lancet*, v.364, n.9442, Oct 9-15, p.1343-60. 2004.
- Su, S. J., L. W. Huang, L. S. Pai, H. W. Liu e K. L. Chang. Homocysteine at pathophysiologic concentrations activates human monocyte and induces cytokine expression and inhibits macrophage migration inhibitory factor expression. *Nutrition*, v.21, n.10, Oct, p.994-1002. 2005.

Turhan, A., L. A. Weiss, N. Mohandas, B. S. Collier e P. S. Frenette. Primary role for adherent leukocytes in sickle cell vascular occlusion: a new paradigm. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v.99, n.5, Mar 5, p.3047-51. 2002.

Van Gils, J. M., J. J. Zwaginga e P. L. Hordijk. Molecular and functional interactions among monocytes, platelets, and endothelial cells and their relevance for cardiovascular diseases. *J Leukoc Biol*, v.85, n.2, Feb, p.195-204. 2009.

Wallace, A., V. Kapoor, J. Sun, P. Mrass, W. Weninger, D. F. Heitjan, C. June, L. R. Kaiser, L. E. Ling e S. M. Albelda. Transforming growth factor-beta receptor blockade augments the effectiveness of adoptive T-cell therapy of established solid cancers. *Clin Cancer Res*, v.14, n.12, Jun 15, p.3966-74. 2008.

Wautier, J. L. e M. P. Wautier. Molecular basis of red blood cell adhesion to endothelium. *Ann Pharm Fr*, v.69, n.1, Jan, p.3-6. 2011.

Wink, D. A. e J. B. Mitchell. Chemical biology of nitric oxide: Insights into regulatory, cytotoxic, and cytoprotective mechanisms of nitric oxide. *Free Radic Biol Med*, v.25, n.4-5, Sep, p.434-56. 1998.

Wood, K. C., L. L. Hsu e M. T. Gladwin. Sickle cell disease vasculopathy: a state of nitric oxide resistance. *Free Radic Biol Med*, v.44, n.8, Apr 15, p.1506-28. 2008.

Wu, G. e S. M. Morris, Jr. Arginine metabolism: nitric oxide and beyond. *Biochem J*, v.336 (Pt 1), Nov 15, p.1-17. 1998.

Xia, Y., V. L. Dawson, T. M. Dawson, S. H. Snyder e J. L. Zweier. Nitric oxide synthase generates superoxide and nitric oxide in arginine-depleted cells leading to peroxynitrite-mediated cellular injury. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v.93, n.13, Jun 25, p.6770-4. 1996.

Zago, M. A. e A. C. S. Pinto. The pathophysiology of sickle cell disease: from the genetic mutation to multiorgan dysfunction. *Rev. bras. hematol. hemoter*, v.29, n.3, p.207-214. 2007.

Zardi, E. M., D. M. Zardi, F. Cacciapaglia, A. Dobrina, A. Amoroso, A. Picardi e A. Afeltra. Endothelial dysfunction and activation as an expression of disease: role of prostacyclin analogs. *Int Immunopharmacol*, v.5, n.3, Mar, p.437-59. 2005.

8. APÊNDICES

- Outros trabalhos em colaboração desenvolvidos no período do doutorado.

Manuscrito I

Associação de marcadores laboratoriais ao perfil clínico em pacientes com Anemia Falciforme de Salvador - Bahia

Gazeta Médica da Bahia, 2010. (Publicado)

Manuscrito II

Association of surface leukocyte molecules and biomarkers of hemolysis and inflammation in sickle cell anemia patients

Journal Leukocyte Biology, 2011. (Submetido)

Manuscrito III

Increased concentrations of IL-18 and uric acid in sickle cell anemia: contribution of hemolysis, endothelial activation and the inflammasome

Cytokine, 2011. (Submetido).

Manuscrito IV

TNF-alpha and IL-8: serum levels and gene polymorphisms (-308G>A and -251A>T) associate with classical biomarkers and medical history in children with sickle cell anemia

Cytokine (Submetido).

ASSOCIAÇÃO DE MARCADORES LABORATORIAIS AO PERFIL CLÍNICO EM PACIENTES COM ANEMIA FALCIFORME DE SALVADOR- BAHIA

LABORATORY MARKERS ASSOCIATED WITH CLINIC ASPECTS ON SICKLE CELL ANEMIA PATIENTS

Bruno A.V. Cerqueira, Wendell V. Boas, Angela A. D. Zanette, Mitermayer G. Reis, Marilda S. Gonçalves
Laboratório de Patologia e Biologia Molecular, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ); Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, Brasil; Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Estado da Bahia (HEMOBA); Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal da Bahia (UFBA), Salvador, Bahia, Brasil

Os eventos vaso-oclusivos na anemia falciforme envolvem interações entre hemácias, células endoteliais, leucócitos, plaquetas, fatores da coagulação e proteínas plasmáticas. O objetivo deste estudo foi investigar marcadores laboratoriais associados com manifestações clínicas em pacientes portadores de anemia falciforme. Nós estudamos 45 pacientes portadores de anemia falciforme em estado clínico estável, provenientes da Bahia, Brasil. As análises hematológicas foram realizadas utilizando contador eletrônico de células; o perfil de hemoglobinas foi confirmado por cromatografia líquida de alto desempenho e os marcadores de hemólise e lipídicos foram quantificados utilizando técnicas bioquímicas. Os níveis séricos de desidrogenase láctica (LDH) e bilirrubinas apresentaram-se elevados nos pacientes com história de síndrome torácica aguda e úlcera de perna, respectivamente. Além disso, pacientes com história de hepatomegalia e úlcera de perna apresentaram elevação na contagem de leucócitos. Os pacientes que passaram por terapias transfusionais apresentaram elevação sérica da aspartato aminotransferase (AST) e aumento na contagem de reticulócitos. Por outro lado, pacientes que apresentaram eventos de sequestro esplênico e que sofreram esplenectomia apresentaram diminuição nos níveis séricos da lipoproteína de alta densidade (HDL). Nossos resultados sugerem importante papel dos marcadores laboratoriais como avaliadores e preditores de eventos clínicos graves na anemia falciforme.

Palavras-chave: anemia falciforme, marcadores laboratoriais, manifestações clínicas.

Manuscript II

Association of surface leukocyte molecules and biomarkers of hemolysis and inflammation in sickle cell anemia patients

Bruno A.V. Cerqueira,^{*,‡} Wendell V. Boas,^{*} Jorge Clarencio,[†] Daniela Andrade,[†] Jose P. Moura Neto,^{*} Angela A.D. Zanette,[§] Manoel Barral-Netto,[†] Mitermayer G. Reis^{*} and Marilda S. Goncalves^{*,¶,1}

^{*} Laboratório de Patologia e Biologia Molecular, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Salvador, Bahia, Brasil; [†] Laboratório Integrado de Microbiologia e Imunoregulação, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Salvador, Bahia, Brasil; [‡] Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, Brasil; [§] Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Estado da Bahia (HEMOBA), Salvador, Bahia, Brasil; [¶] Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Faculdade de Farmácia da Universidade Federal da Bahia (UFBA), Salvador, Bahia, Brasil.

ABSTRACT

The leukocyte activation profile of sickle cell patient and the interaction of this with the biomarkers of hemolysis and inflammation could provide insight into patient prognosis and improve knowledge about the pathogenesis of vaso-occlusive episodes (VOE) in sickle cell anemia (SCA). Herein, we investigate the expression of surface molecules on leukocytes in the basal state and during lipopolysaccharide (LPS) stimulation, associating the biomarkers of hemolysis, lipids, cytokines, hematological parameters and soluble adhesion molecule. The surface CD11b expression of neutrophils and monocytes in patients was higher than in controls; however, CD62L expression on neutrophils was lower in patients than in controls before and after LPS challenge. CD11b and CD32 expression level on neutrophils were positively correlated with platelet counts and low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C) levels, respectively, while CD62L expression was negatively correlated with platelet counts. CD11b and CD18 expression levels on lymphocytes were positively correlated with uric acid and sVCAM-1 levels, respectively, while CD62L expression was negatively correlated with platelet count, sICAM-1 and TNF-alpha levels. Surface CD32 expression on monocytes in patients was lower than in controls in the basal state, further correlated negatively with AST and hemoglobin S. A low CD32 expression on monocytes was associated with high LDH levels, and CD62L expression was positively correlated with high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C) and hemoglobin. We suggest an important role of surface leukocyte molecules for the maintenance of a chronic inflammatory process as well as for the clinical severity of SCA via a possible interaction with the biomarkers of hemolysis and inflammation.

Keywords: monocyte, lymphocyte, neutrophil, lipopolysaccharide, inflammation, biomarkers

Manuscript III

Title: Increased concentrations of IL-18 and uric acid in sickle cell anemia: contribution of hemolysis, endothelial activation and the inflammasome

Bruno A.V. Cerqueira,^{a,b} Wendell V. Boas,^a Angela A.D. Zanette,^c Mitermayer G. Reis^a and Marilda S. Goncalves^{a,d*}

^aLaboratório de Patologia e Biologia Molecular, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Salvador, Bahia, Brasil; ^bUniversidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, Brasil; ^cFundação de Hematologia e Hemoterapia do Estado da Bahia (HEMOBA), Salvador, Bahia, Brasil; ^dDepartamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Faculdade de Farmácia da Universidade Federal da Bahia (UFBA), Salvador, Bahia, Brasil.

BAVC and WVB contributed equally to this manuscript.

ABSTRACT

Sickle cell anemia (SCA) is a common, severe monogenetic disorder characterized by chronic hemolysis, frequent infections, a chronic inflammatory state and recurrent occlusions of the microcirculation, resulting in painful crises, organ damage and premature death. This study evaluated associations between serum levels of IL-18, uric acid, hemolytic markers and inflammatory molecules in SCA patients. A cross-sectional study was performed including 45 SCA patients (median age 20.5 years) without general symptoms and who had not undergone blood transfusions. Inclusion criteria for the steady-state SCA patients were the absence of hospitalization and the absence of infections. IL-18 and uric acid were correlated closely with markers of hemolysis, endothelial dysfunction and cytokine levels. These findings suggest probable influences of IL-18 and uric acid in the pathophysiology of vascular occlusion in SCA. Additional studies should be performed to characterize similar prognosis markers and possible therapeutic targets.

Keywords: Sickle cell anemia; cytokine; inflammation

Manuscript IV

Title: TNF-alpha and IL-8: serum levels and gene polymorphisms (-308G>A and -251A>T) associate with classical biomarkers and medical history in children with sickle cell anemia

Cajado, C.^a; Cerqueira, B. A. V.^a; Couto, F. D.^a; Moura-Neto, J. P.^a; Vilas-Boas, W.^a; Dorea, M.J.^a; Lyra, I.M.,^c; Barbosa, C. G.^a; Reis, M.G.^a; Goncalves, M.S.^{a,b,*}.

^a Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Salvador, Bahia, Brasil

^b Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal da Bahia (UFBA), Salvador, Bahia, Brasil

^c Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Estado da Bahia (HEMOBA), Salvador, Bahia, Brasil

*Corresponding author:

Marilda Souza Goncalves, Ph.D., Rua Waldemar Falcão 121 Brotas, CEP: 40.295-001, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz - Laboratório de Patologia e Biologia Molecular, Salvador-Bahia-Brasil;

Telephone: 55 71 3176-2265 or 55 71 3176-2226

mari@bahia.fiocruz.br

ABSTRACT

Sickle cell anemia (SCA) has a heterogeneous clinical outcome. The present study investigated the *Tumor Necrosis Factor- alpha (TNF-alpha)* -308G>A and *Interleukin 8 (IL-8)* -251A>T gene polymorphisms, associating with medical history and classical biomarkers in children with steady-state SCA. In total, 251 SCA patients aged 2 to 21 years and 200 healthy controls were studied. Gene polymorphisms, beta^S-globin haplotypes and *alpha2-thalassemia* with a 3.7-kb deletion (α_2 -thal^{3.7 kb}) were investigated by PCR/RFLP analysis, and cytokine levels by ELISA. Splenomegaly ($p=.01$), splenic sequestration ($p=.02$), upper respiratory tract infection (URTI) ($p=.042$) and pneumonia ($p<.0001$) were more prevalent among children up to 5 years of age. The A allele of the *IL-8* -251A>T gene polymorphism was associated with the occurrence of URTI (OR=14.2, 95%CI: 3.01-73.34, $p<.0001$). The A allele of the *TNF-alpha* -308G>A polymorphism was associated with splenic sequestration episodes (OR=8.3, 95%CI: 3.30-21.11, $p<.0001$) and high TNF-alpha levels ($p=.021$). The hemoglobin F and hemoglobin S were correlate with IL-8 serum levels. The multivariate analyses show a significant association of *TNF-alpha* and *IL-8* gene polymorphisms, beta^S- globin haplotypes and α_2 -thal^{3.7kb} with clinical events. These results point to the important role of the TNF and IL-8 cytokines and gene polymorphisms in the pathophysiologic and clinical features of SCA, emphasizing the sum of the effects of biomarkers in the clinical of this disease.

Keywords: Sickle cell anemia; TNF-alpha; IL-8; gene polymorphisms; beta^S- globin haplotypes; alpha2-thalassemia