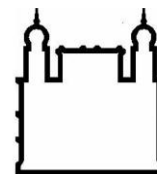




**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE MEDICINA
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ**



Curso de Pós-Graduação em Patologia Humana e Experimental

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**CÉLULAS ENDOTELIAIS ATIVADAS PELO HEME: AVALIAÇÃO DE
DIFERENTES ABORDAGENS TERAPÊUTICAS**

CAROLINE CONCEIÇÃO DA GUARDA

Salvador – Bahia

2015

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

Curso de Pós-Graduação em Patologia Humana e Experimental

**CÉLULAS ENDOTELIAIS ATIVADAS PELO HEME: AVALIAÇÃO DE
DIFERENTES ABORDAGENS TERAPÊUTICAS**

CAROLINE CONCEIÇÃO DA GUARDA

Orientadora: Prof^a Dr^a Marilda de Souza Gonçalves

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Patologia Humana e Experimental para a obtenção do título de Mestre.

Salvador – Bahia

2015

“CÉLULAS ENDOTELIAIS ATIVADAS PELO HEME: AVALIAÇÃO DE
DIFERENTES ABORDAGENS TERAPÊUTICAS”

CAROLINE CONCEIÇÃO DA GUARDA

FOLHA DE APROVAÇÃO

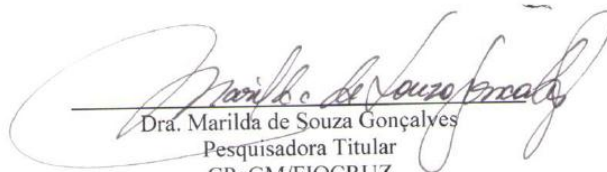
COMISSÃO EXAMINADORA



Dr. Erich Vinicius de Paula
Professor Assistente
UNICAMP



Dr. Ricardo Riccio Oliveira
Pesquisador
CPqGM/FIOCRUZ



Dra. Marilda de Souza Gonçalves
Pesquisadora Titular
CPqGM/FIOCRUZ

Sometimes you find yourself
having to put all your faith in no
faith

Pearl Jam

Dedico este trabalho à memória de meu avô Adelino.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiro a Deus, por todos os ensinamentos e pela sabedoria adquirida ao longo dessa jornada;

A minha mãe Sônia, pela paciência, amor e cuidado incondicional e inabalável;

A minha irmã Aline pelo zelo e ao meu sobrinho Arthur pelas risadas;

A minha família pelo apoio e fraternidade frequentes;

Aos amigos Nilton e Fernanda, pelos longos anos da eterna amizade;

A minha querida orientadora, Pró Marilda pela valiosa orientação, pela oportunidade de desenvolver este trabalho, pela confiança e paciência;

A Dra. Valéria Borges e a Dra. Dalila Zanette pelas inúmeras contribuições e discussões profícuas;

Aos amigos do Laboratório de Hematologia Genética e Biologia Computacional: Silvana Souza, Milena Aleluia, Rayra Santiago, Luciana Fiuza, Thassila Pitanga, Sanzio Santana, Júnia Dutra, Camylla Vilas Boas, Corynne Adanho, Isa Cristina, Jeanne Santana, Rodrigo Mota, Jean Brito, Jane Monteiro e Elze Leite;

Aos amigos do LETI Cássio e Afrânio pela valiosa ajuda com os ELISAs;

Aos MEIGOS & ABUSADOS, 2012; ORDINÁRIOS, 2013; COISINHAS, 2014: Afrânio Evagelista, Candace Andrade, Jaqueline Góes, Regina Nascimento, Máira Silva, Marcus Vinícius, Igor Ives e Tayane Fernandes;

Aos eternos amigos da faculdade: Ohana Oliveira, Vanessa Martins, Tiago Barbosa e Carolzona Bizerra (NVN);

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Patologia Humana e Experimental do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz;

Aos serviços prestados por todos os funcionários da Biblioteca de Ciências Biomédicas Eurydice Pires de Sant'Anna;

Ao CNPq pela concessão da bolsa;

A todos que contribuíram de alguma forma com a realização deste trabalho.

GUARDA, Caroline Conceição da. Células endoteliais ativadas pelo heme: avaliação de diferentes abordagens terapêuticas 106 f. il. Dissertação (Mestrado) Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Salvador, 2015.

RESUMO

A anemia falciforme (AF) é uma doença genética, que possui quadro clínico heterogêneo, caracterizado por crises de dor, priapismo, síndrome torácica aguda, acidente vascular cerebral (AVC) e eventos hemolíticos, dentre outros. A hemólise tem como consequência a liberação de grandes quantidades de hemoglobina e heme livre nos espaços intravasculares, com ativação endotelial. Desta forma, a vasculopatia e a disfunção endotelial são alterações importantes entre os eventos crônicos descritos na AF, que contribuem para a patogênese do AVC, doença renal e hipertensão pulmonar. O heme é uma molécula pró-inflamatória, capaz de ativar diretamente o endotélio vascular, bem como a produção de espécies reativas de oxigênio. Por isso, o objetivo deste estudo foi avaliar a expressão de fator tecidual, óxido nítrico sintase endotelial (eNOS), óxido nítrico (NO) e fator induzível por hipóxia- α (HIF- α) em células HUVEC (*Human umbilical vein endothelial cells*) ativadas pelo heme, em resposta à ação de drogas que possuem diferentes mecanismos. A produção de fator tecidual, eNOS, e HIF- α pelas células HUVEC foi investigada por ELISA. O óxido nítrico (NO) foi dosado pelo método de Griess, sendo que as células foram estimuladas pelo heme e tratadas ou não com sinvastatina, hidroxiuréia (HU) e ácido ascórbico. A produção de fator tecidual pelas células HUVEC foi influenciada pelo ácido ascórbico e pela HU, e também pela associação entre os dois tratamentos, sugerindo um possível mecanismo de redução das alterações hemostáticas. A produção de nitrito pelas células HUVEC foi aumentada mediante estímulo pelo heme e reduzida quando houve tratamento com HU. Os mecanismos de produção de nitrito, óxido nítrico ou peroxinitrito pelas células quando influenciadas pelas drogas ainda precisam ser mais bem caracterizados. A produção de eNOS quando as células foram estimuladas com heme foi heterogênea, e a interação entre o heme e as drogas na produção da enzima precisa ser melhor caracterizada com o objetivo de compreender os mecanismos de disfunção endotelial. A produção do HIF- α foi aumentada após estímulo das células pelo heme, porém, os tratamentos com sinvastatina e ácido ascórbico ainda precisam ser mais bem compreendidos, uma vez que essas drogas possuem diferentes mecanismos de ação. Desse modo, sugerimos que o microambiente hemolítico vascular da AF requer diferentes abordagens terapêuticas, que devem ser voltadas para os diferentes mecanismos e alvos moleculares descritos na AF, tendo em vista que a inflamação crônica frequente nos pacientes possui diversos efeitos sistêmicos.

Palavras-chave: Endotélio, Heme, Sinvastatina, Hidroxiuréia, Ácido ascórbico.

GUARDA, Caroline Conceição da. Endothelial cells activated by heme: evaluation of different therapeutic approaches 106 f. il. Dissertação (Mestrado) Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Salvador, 2015.

ABSTRACT

Sickle cell anemia (SCA) is a genetic disease, which has heterogeneous clinical features, characterized by pain crises, priapism, acute chest syndrome, cerebral vascular accident (CVA) and hemolytic events, among others. Hemolysis causes the release of large amounts of free heme and hemoglobin in intravascular spaces with endothelial activation. Thus, endothelial dysfunction and vascular disease are major chronic events described in SCA, that contribute to the pathogenesis of stroke, renal and pulmonary hypertension. Heme is a pro-inflammatory molecule able to directly activate vascular endothelium, as well as the production of reactive oxygen species. Therefore, the aim of this study was to evaluate the expression of tissue factor, endothelial nitric oxide synthase (eNOS), nitric oxide (NO) and hypoxia inducible factor α (HIF- α) in HUVECs (Human umbilical vein endothelial cells) activated by heme in response to the action of drugs that have different mechanisms. Tissue factor production, eNOS, and HIF- α were investigated in HUVECs and evaluated by ELISA. Nitric oxide (NO) was measured by the Griess technique, and the cells were stimulated by heme and treated or not with simvastatin, hydroxyurea (HU), and ascorbic acid. The tissue factor production by HUVEC cells was influenced by ascorbic acid and the HU and also the association between both treatments, suggesting a possible mechanism for reducing the hemostatic abnormalities. The nitrite production by HUVECs was enhanced by stimulation with heme and was reduced when treatment with HU. The nitrite production mechanisms, nitric oxide or peroxynitrite by cells when affected by drugs should be further characterized. Production of eNOS when cells were stimulated by heme was heterogeneous, and the interaction between the drug, the heme, and the enzyme production needs to be better characterized with the aim of better understand the mechanisms of endothelial dysfunction. The production of HIF- α when the cells were stimulated by heme was increased, but the effects of simvastatin and ascorbic acid still need to be better understood, since these drugs have different mechanisms of action. Thus, we suggest that the hemolytic vascular microenvironment in SCA requires different therapeutic approaches, that need to be directed to the different molecular targets and mechanisms described in the SCA, once the frequent chronic inflammation in these patients has several systemic effects.

Key-words: Endothelium, Heme, Simvastatin, Hydroxyurea, Ascorbic acid.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Representação gráfica do fenômeno vaso-oclusivo presente na doença falciforme, mostrando a participação de leucócitos, plaquetas, reticulócitos, hemácias normais e falcizadas e células endoteliais.	21
Figura 2	Interações ocorridas entre o eritrócito falcizado e o endotélio vascular pelo aumento da expressão de moléculas de adesão.	26
Figura 3	Efeitos tóxicos do heme (KUMAR & BANDYOPADHYAY, 2005).	30
Figura 4	Etapas da produção de radicais livres pela reação de Fenton (ARAÚJO et al., 2011)	31
Figura 5	Desenho experimental dos ensaios de ativação celular in vitro em modelo de endotélio vascular com células HUVEC	44
Figura 6	Marcação extracelular direta da molécula de adesão CD54-ficoeritina (PE) em células HUVEC de linhagem imortalizada	50
Figura 7	Efeito dos tratamentos e do heme nas várias concentrações utilizadas nos ensaios para produção de fator tecidual pelas células HUVEC, em comparação com o controle negativo, n=3, média das triplicatas, *p<0,05; **p<0.01; ***p<0,001 (teste t independente).	52
Figura 8	Efeito da hidroxiuréia e do estímulo com concentrações crescentes de heme (30µM, 50µM, 70µM) na produção de fator tecidual pelas células HUVEC, em comparação com a ausência de tratamento, n=3, média das triplicatas, *p<0,05; **p<0.01; ***p<0,001 (teste t independente).	54
Figura 9	Efeito da sinvastatina e do estímulo com concentrações crescentes de heme (30µM, 50µM, 70µM) na produção de fator tecidual pelas células HUVEC, em comparação com a ausência de tratamento, n=3, média das triplicatas, *p<0,05; **p<0.01; ***p<0,001 (teste t independente).	56
Figura 10	Efeito do ácido ascórbico e do estímulo com concentrações crescentes de heme (30µM, 50µM, 70µM) na produção de fator tecidual pelas células HUVEC, em comparação com a ausência de tratamento, n=3, média das triplicatas, *p<0,05; **p<0.01;	58

*** $p < 0,001$ (teste t independente).

- Figura 11 Efeito da combinação dos tratamentos e do estímulo com heme na produção de fator tecidual pelas células HUVEC, em comparação com a ausência de tratamento, $n=3$, média das triplicatas, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ (teste t independente) 59
- Figura 12 Efeito dos tratamentos e do heme nas várias concentrações utilizadas nos ensaios para produção de nitrito pelas células HUVEC, em comparação ao controle negativo, $n=3$, média das triplicatas, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ (teste t independente) 61
- Figura 13 Efeito da hidroxiuréia e do estímulo com concentrações crescentes de heme (30 μ M, 50 μ M, 70 μ M) na produção de nitrito pelas células HUVEC, em comparação com a ausência de tratamento, $n=3$, média das triplicatas, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ (teste t independente) 62
- Figura 14 Efeito da sinvastatina e do estímulo com concentrações crescentes de heme (30 μ M, 50 μ M, 70 μ M) na produção de nitrito pelas células HUVEC, em comparação com a ausência de tratamento, $n=3$, média das triplicatas, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ (teste t independente). 64
- Figura 15 Efeito do ácido ascórbico e do estímulo com concentrações crescentes de heme (30 μ M, 50 μ M, 70 μ M) na produção de nitrito pelas células HUVEC, em comparação com a ausência de tratamento, $n=3$, média das triplicatas, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ (teste t independente) 66
- Figura 16 Efeito da combinação dos tratamentos e do estímulo com heme na produção de nitrito pelas células HUVEC, em comparação ao tratamento apenas com hidroxiuréia, $n=3$, média das triplicatas, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ (teste t independente). 67
- Figura 17 Efeito dos tratamentos e do heme nas várias concentrações utilizadas nos ensaios para produção de eNOS pelas células HUVEC, em comparação com o controle negativo, $n=3$, média das triplicatas, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ (teste t independente). 68
- Figura 18 Efeito da hidroxiuréia e do estímulo com concentrações crescentes de heme (50 μ M, 70 μ M) na produção de eNOS pelas células HUVEC, em comparação com a ausência de tratamento, 70

n=3, média das triplicatas, *p<0,05; **p<0.01; ***p<0,001 (teste t independente).

- Figura 19 Efeito da sinvastatina e do estímulo com concentrações crescentes de heme (50µM, 70µM) na produção de eNOS pelas células HUVEC, em comparação com a ausência de tratamento, n=3, média das triplicatas, *p<0,05; **p<0.01; ***p<0,001 (teste t independente). 71
- Figura 20 Efeito do ácido ascórbico e do estímulo com concentrações crescentes de heme (30µM, 50µM, 70µM) na produção de eNOS pelas células HUVEC, em comparação com a ausência de tratamento, n=3, média das triplicatas, *p<0,05; **p<0.01; ***p<0,001 (teste t independente). 73
- Figura 21 Efeito dos tratamentos e do heme nas várias concentrações utilizadas nos ensaios para produção de HIF-α células HUVEC, em comparação com o controle negativo, n=3, média das triplicatas, *p<0,05; **p<0.01; ***p<0,001 (teste t independente). 74
- Figura 22 Efeito dos tratamentos e do estímulo com 30µM de heme para produção de HIF-α células HUVEC, n=3, média das triplicatas, *p<0,05 (ANOVA) 75
- Figura 23 Efeito da hidroxiuréia e do estímulo com concentrações crescentes de heme (50µM, 70µM) na produção de HIF-α pelas células HUVEC, em comparação com a ausência de tratamento, n=3, média das triplicatas, *p<0,05; **p<0.01; ***p<0,001 (teste t independente). 77
- Figura 24 Efeito da sinvastatina e do estímulo com concentrações crescentes de heme (50µM, 70µM) na produção de HIF-α pelas células HUVEC, em comparação com a ausência de tratamento, n=3, média das triplicatas, *p<0,05; **p<0.01; ***p<0,001 (teste t independente). 78
- Figura 25 Efeito do ácido ascórbico e do estímulo com concentrações crescentes de heme (50µM, 70µM) na produção de HIF-α pelas células HUVEC, em comparação com a ausência de tratamento, n=3, média das triplicatas, *p<0,05; **p<0.01; ***p<0,001 (teste t independente) 79
- Figura 26 Efeito da combinação dos tratamentos e do estímulo com heme na produção de HIF-α pelas células HUVEC a) em comparação 80

com o tratamento apenas com hidroxiuréia; b) em comparação com o tratamento apenas com sinvastatina, n=3, média das triplicatas, *p<0,05; **p<0.01; ***p<0,001 (teste t independente)

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AF	Anemia Falciforme
AVC	Acidente vascular cerebral
DHA	Ácido deidroascórbico
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
eNOS	Óxido nítrico sintase endotelial
FT	Fator tecidual
GM-CSF	Fator estimulador de colônia granulócito-monócito
Hb	Hemoglobina
HbA	Hemoglobina A
HbF	Hemoglobina Fetal
HbS	Hemoglobina S
HIF- α	Fator induzível por hipóxia- α
HU	Hidroxiuréia
HUVEC	Células endoteliais de cordão umbilical humano, do inglês <i>Human Umbilical Vein Endothelial Cells</i>
ICAM-1	Molécula de adesão intercelular-1
IL-1	Interleucina-1
IL-10	Interleucina-10
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
LFA-1	<i>Lymphocyte function associated-1</i>
Mac-1	<i>Macrophage-1 antigen</i>
NF- κ B	Fator Nuclear Kappa B
NO	Óxido nítrico
PBS	Solução salina tamponada, do inglês <i>Phosphate buffered saline</i>
PCR	Proteína C reativa
ROS	Espécies reativas de oxigênio, do inglês <i>Reactive Oxygen Species</i>
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
STA	Síndrome torácica aguda
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral- α
VCAM-1	Molécula de adesão vascular-1
VLA-4	<i>Very-late antigen 4</i>

VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular
VOC	Crise vaso-oclusiva

LISTA DE SÍMBOLOS

α	Alfa
β	Beta
μ	Mu
κ	Kappa

SUMÁRIO

1	REVISÃO DE LITERATURA	18
1.1	DOENÇA FALCIFORME	18
1.2	VASO-OCCLUSÃO	20
1.3	FUNÇÃO ENDOTELIAL NA ANEMIA FALCIFORME.....	23
1.4	HEME E INFLAMAÇÃO.....	28
1.5	HIDROXIURÉIA.....	33
1.6	ESTATINAS.....	35
1.7	ÁCIDO ASCÓRBICO	37
2	JUSTIFICATIVA	39
3	OBJETIVOS	41
3.5	OBJETIVO GERAL	41
3.6	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	41
4	MÉTODOS	42
4.1	CULTURA DE CÉLULAS ENDOTELIAIS.....	42
4.2	ENSAIOS DE ATIVAÇÃO CELULAR	43
4.3	PREPARO DAS DROGAS	45
4.3.1	Heme	45
4.3.2	Hidroxiuréia.....	45
4.3.4	Sinvastatina Sódica	46
4.3.5	Ácido Ascórbico	46
4.4	ELISA PARA FATOR TECIDUAL/FATOR III DA COAGULAÇÃO	46
4.5	ELFIA PARA FATOR INDUZÍVEL POR HIPÓXIA- A (HIF-A) TOTAL ...	47
4.6	ELISA PARA ÓXIDO NÍTRICO SINTASE ENDOTELIAL (ENOS).....	48
4.7	DOSAGEM DE ÓXIDO NÍTRICO (NO).....	49

4.8	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	49
4.9	CONSIDERAÇÕES ÉTICAS	49
5	RESULTADOS	50
5.1	CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA DAS CÉLULAS HUVEC	50
5.2	PRODUÇÃO DE FATOR TECIDUAL	51
5.2.1	Efeito da hidroxauréia na produção de fator tecidual pelas células HUVEC estimuladas pelo heme	52
5.2.2	Efeito da sinvastatina na produção de fator tecidual pelas células HUVEC estimuladas pelo heme	55
5.2.3	Efeito do ácido ascórbico na produção de fator tecidual pelas células HUVEC estimuladas com heme	57
5.2.4	Efeito da combinação dos tratamentos na produção de fator tecidual por células HUVEC estimuladas com heme	59
5.3	DOSAGEM INDIRETA DE ÓXIDO NÍTRICO.....	60
5.3.1	Efeito da hidroxauréia na produção de nitrito pelas células HUVEC estimuladas com heme	61
5.3.2	Efeito da sinvastatina na produção de nitrito pelas células HUVEC estimuladas com heme	63
5.3.3	Efeito do ácido ascórbico na produção de nitrito pelas células HUVEC estimuladas com heme	65
5.3.4	Efeito da combinação dos tratamentos na produção de nitrito pelas células HUVEC estimuladas com heme	67
5.4	PRODUÇÃO DE ENOS	67
5.4.1	Efeito da hidroxauréia na produção de eNOS pelas células HUVEC estimuladas com heme	69
5.4.2	Efeito da sinvastatina na produção de eNOS pelas células HUVEC estimuladas com heme	70
5.4.3	Efeito do ácido ascórbico na produção de eNOS pelas células HUVEC estimuladas com heme	72
5.5	PRODUÇÃO DE HIF-A.....	73
5.5.1	Efeito da hidroxauréia na produção de HIF- α pelas células HUVEC estimuladas com heme	75

5.5.2	Efeito da sinvastatina na produção de HIF- α pelas células HUVEC estimuladas com heme	77
5.5.3	Efeito do ácido ascórbico na produção de HIF- α pelas células HUVEC estimuladas com heme	79
5.5.4	Efeito das combinações dos tratamentos na produção de HIF- α pelas células HUVEC estimuladas com heme	80
6	DISCUSSÃO	82
6.1	EFEITOS DA HIDROXIURÉIA.....	83
6.2	EFEITOS DA SINVASTATINA.....	86
6.3	EFEITOS DO ÁCIDO ASCÓRBICO	89
7	CONCLUSÕES	93
	REFERÊNCIAS	94

1 REVISÃO DE LITERATURA

1.1 DOENÇA FALCIFORME

A primeira doença genética em que se verificou que a presença de uma proteína mutante causava sintomas clínicos foi a anemia falciforme (AF). A substituição de um nucleotídeo ($GAG \rightarrow GTG$) provoca a troca de aminoácido (substituição de ácido glutâmico por valina) na sexta posição da porção amino terminal da globina β ($\beta^{Glu-Val}$), no cromossomo 11, o que leva a síntese da hemoglobina (Hb) variante, denominada hemoglobina S ($\alpha_2\beta_2^S$), a qual forma longos polímeros em tensão de oxigênio diminuída (PAULING et al., 1949; INGRAM et al., 1956; STEINBERG, 1999). A formação dos longos polímeros proteicos, por sua vez, desencadeia a cascata de inúmeras anormalidades celulares que participam de maneira geral no mecanismo fisiopatológico da AF (ODIÉVRE et al., 2011). A hemoglobina S (HbS) em situações de baixa tensão de oxigênio sofre modificações devido à interação de natureza hidrofóbica da valina com a fenilalanina da posição 85 e com a leucina da posição 88, desencadeando assim, a formação de polímeros no processo de nucleação, com a criação de uma estrutura multipolimérica (SILVA e SHIMAUTI, 2006; NAOUM, 2000; GALIZA NETO e PITOMBEIRA, 2003; STEINBERG, 2008).

A cinética de falcização, processo em que os polímeros são formados e o eritrócito assume a morfologia alterada, depende de três aspectos: 1) grau de desoxigenação; 2) concentração intracelular de HbS e, 3) presença ou ausência de hemoglobina fetal (HbF). O processo requer certo tempo para ser iniciado, o chamado “tempo de retardo” (*delay time*), que é inversamente proporcional à concentração intracelular de HbS (ODIÉVRE et al., 2011). Essas alterações físico-químicas, além de deformar e enrijecer a membrana eritrocitária, ocasionam o fenômeno patológico da vaso-oclusão (VOC), ao predispor os eritrócitos a aderirem ao endotélio vascular (SILVA & SHIMAUTI, 2006). Repetidos ciclos de falcização e retorno do eritrócito à morfologia normal podem causar lesão grave na membrana, gerando espécies reativas de oxigênio (ROS). Esse processo também pode levar a homeostase anormal dos cátions, resultando em eritrócitos desidratados e irreversivelmente

falcizados, cuja morfologia tende a exacerbar a anemia hemolítica subjacente e as obstruções vasculares (CHIANG e FRENETTE, 2005).

A AF possui herança autossômica recessiva, com clínica heterogênea devido a diversos fatores, tais como interações com fatores ambientais, étnicos, sociais e econômicos, além de marcadores genéticos secundários a fenômenos epigenéticos (CERQUEIRA et al., 2011). Os indivíduos com AF exibem fenótipos variados, mesmo dentro de um genótipo primário específico comum a todos (HEBBEL et al., 2004). A AF é uma doença crônica caracterizada pela presença de eventos agudos e crônicos que diminuem a expectativa de vida do paciente. Os episódios agudos de dor torácica, nas costas, abdome ou extremidades estão entre os principais sintomas clínicos presente na AF, sendo que os episódios podem durar dias ou até semanas. A síndrome torácica aguda (STA) é uma complicação frequente e muitas vezes fatal que afeta cerca de 40% dos pacientes com AF (STEINBERG, 2008). Em um ano, estima-se que aproximadamente 60% dos pacientes com AF sofrerão um episódio de crise dolorosa. Contudo, apenas uma pequena minoria dos pacientes terá crises constantes, sendo que essa diversidade clínica presente na AF complica a escolha do tratamento. As crises dolorosas apresentadas pelos pacientes com AF são causadas por infecções, exposição a temperaturas extremas, estresse físico ou emocional, porém, frequentemente, não causa evidente e possuem início insidioso (STEINBERG, 1999; PLATT et al., 1991; REES e GIBSON, 2011).

Os eritrócitos irreversivelmente falcizados, formados em decorrência da redução do oxigênio ou hipóxia, são removidos e destruídos tanto no meio extravascular como no intravascular, com encurtamento na sobrevida média de 120 dias para cerca de 17 dias, fato que contribui para o agravamento da anemia nos pacientes com AF (SILVA e SHIMAUTI, 2006; REES e GIBSON, 2011). Entre as características associadas a AF, podemos mencionar a vulnerabilidade à hemólise crônica, aumento da susceptibilidade a infecções e crises vaso-oclusivas dolorosas que culminam em dano isquêmico crônico a diferentes órgãos, disfunção e morte precoce (NEBOR et al., 2010). Além dos aspectos próprios da morfologia eritrocitária, mecanismos associados a fatores genéticos e moleculares também participam da patogênese da AF. Os principais são os haplótipos ligados ao grupo de genes da globina β^S (Benin,

Bantu, Senegal, Camarões e Árabe-Indiano); a associação com outras hemoglobinopatias, como a talassemia alfa (α) e a talassemia beta (β) e a presença da Persistência Hereditária de Hemoglobina Fetal (PHHF) (NEBOR et al., 2010; BANDEIRA et al., 2014; RAHIMI et al., 2003). Todas as condições que são capazes de interferir na concentração intra-eritrocitária de HbS podem modificar o curso clínico da doença.

No Brasil, observa-se que a frequência do alelo β^S é heterogênea e varia entre as diferentes regiões do país. No estado de São Paulo foi observada a frequência de 6,6 % para os heterozigotos AS (HbAS), quando se estudou descendentes de africanos (RAMALHO, 1986). No estado de Minas Gerais é estimada a razão de 1/1250 crianças nascidas com doença falciforme (DF) (NIETERT et al., 2002). Em triagem de hemoglobinopatias realizada em sangue de cordão umbilical em Pernambuco foi observada a frequência de 5,1 % de heterozigotos HbAS (BANDEIRA et al., 1999). A análise de hemoglobinas em 1200 crianças em idade escolar no estado da Bahia descreveu a frequência de 7,4 % para indivíduos HbAS (AZEVEDO et al., 1980). Já a triagem de hemoglobinas em recém-nascidos da cidade de Salvador encontrou a frequência de 9,8 % para indivíduos HbAS e a prevalência de 0,2% para aqueles com DF (ADORNO et al., 2005). A triagem neonatal realizada pela Associação de Pais e Amigos dos Excepcionais do estado da Bahia (APAE-BA) indica que a Bahia apresenta a razão de 1/645 nascimentos de crianças com DF, sendo o estado brasileiro com a maior prevalência da doença (SILVA et al., 2006).

1.2 VASO-OCCLUSÃO

A forma de foice dos eritrócitos foi considerada durante muito tempo a causa primária da VOC e de outras complicações descritas na AF (WAGENER et al., 2001). Contudo, como consequência da polimerização da HbS e alterações nas hemácias, os indivíduos com a AF apresentam estado inflamatório crônico no qual, em conjunto com a disfunção endotelial, o estresse oxidativo e a adesão celular, iniciam a VOC, um processo de várias etapas que envolve diferentes tipos celulares (ALMEIDA et al., 2011).

A VOC, independente de sua causa inicial, contribui para isquemia tecidual e disfunção endotelial, o que favorece a inflamação. Por outro lado, a inflamação também pode exercer papel iniciador do evento (HEBBEL et al., 2004). Dados mais recentes indicam que há participação direta do endotélio vascular, de interações celulares múltiplas e complexas, e uma ativação celular global mediada pela inflamação, no início do desenvolvimento e na propagação da VOC (ODIÈVRE et al., 2011; BUNN, 1997) (Figura 1)

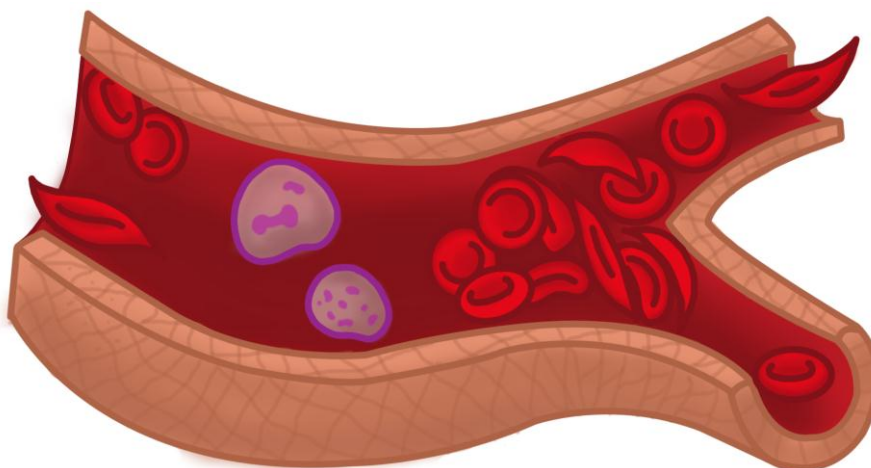


Figura 1. Representação gráfica do fenômeno vaso-oclusivo presente na doença falciforme, mostrando a participação de leucócitos, plaquetas, reticulócitos, hemácias normais e falcizadas e células endoteliais.

O fenômeno parece ser subdividido em dois passos consecutivos, sendo que o primeiro envolve a adesão de reticulócitos de estresse, aqueles produzidos pela medula em resposta à anemia, ao endotélio de vênulas pós-capilares, diminuindo o fluxo sanguíneo, causando uma espécie de estase vascular, e, desse modo, induzindo e propagando a falcização de hemácias maduras, que são mantidas por muito tempo em condições de hipóxia. Este primeiro passo leva ao segundo, que corresponde ao aprisionamento das hemácias irreversivelmente falcizadas e de outros elementos figurados do sangue, que completam a oclusão dos micro-vasos (ODIÈVRE et al., 2011; BUNN, 1997). A dúvida sobre qual evento ocorre primeiro, se a inflamação ou a vaso-oclusão ainda permanece; talvez estes ocorram simultaneamente, resultando num círculo repetitivo e indissociável (BELCHER et al., 2000).

A leucocitose é um achado laboratorial constante entre os pacientes com AF, o que configura um elemento prejudicial no prognóstico da doença (ODIÈVRE et al., 2011; PLATT et al., 1994). A presença de leucócitos aderentes nas vênulas pós-capilares sugere que, devido ao seu volume celular, eles são os maiores participantes da diminuição do fluxo sanguíneo contribuindo para o início do evento de VOC (ODIÈVRE et al., 2011). As interações entre os monócitos e o endotélio vascular desempenham papel importante em doenças inflamatórias de maneira geral, e podem modular a vasculopatia na AF. Os leucócitos interagem não apenas com o endotélio vascular, mas também com os eritrócitos falcizados circulantes e com plaquetas (SAFAYA et al., 2012). Mesmo em pacientes com AF em estado-estável, a leucocitose é um fator de risco para a STA, acidente vascular cerebral (AVC) e mortalidade precoce (JOHNSON e TELEN, 2008).

A hemólise presente nos diferentes tipos de hemoglobinopatias é restrita ao sistema reticuloendotelial, enquanto na AF a hemólise acontece de forma extra e intravascular (WAGENER et al., 2001), o que também contribui para o microambiente propício à VOC. A polimerização da HbS em pacientes com DF leva a desestabilização da membrana do eritrócito e a destruição prematura de 10% do total de eritrócitos a cada 24 horas, o que é equivalente a descompartimentalização de até 30g de Hb por dia (REITER et al., 2002). A auto-oxidação da Hb e a subsequente liberação do grupamento heme da sua molécula acontece mais rápido com a HbS do que com a HbA, sendo que o papel patológico para a deposição de heme na oxidação de membranas já foi descrito na AF (REITER et al., 2002; BROWNE et al., 1998). A Hb descompartimentalizada, por exemplo, em concentrações tão baixas quanto 6 μ M pode eliminar a vasodilatação provocada pelo NO (REITER et al., 2002; POHL e LAMONTAGNE, 1991), o que contribui de maneira significativa com as alterações hemostáticas e VOC na AF. Estes episódios vaso-oclusivos constituem a maior causa de morbidade e mortalidade na AF, com a oclusão vascular seguida por isquemia ou infarto em vários tecidos, culminando progressivamente com a lesão definitiva nos diferentes órgãos (JOHNSON e TELEN, 2008).

1.3 FUNÇÃO ENDOTELIAL NA ANEMIA FALCIFORME

O endotélio consiste em um dos reguladores centrais da hemostasia, em especial no que se refere a sua habilidade de expressar agentes procoagulantes, anticoagulantes, vasoconstritores, vasodilatadores, assim como moléculas de adesão e citocinas (WAKEFIELD et al., 2008). As células endoteliais inexoravelmente ligam esses dois processos homeostáticos fundamentais, uma vez que residem na interface dos sistemas inflamatório e de coagulação (HEBBEL et al., 2004). Em condições normais, as células endoteliais sustentam o estado vasodilatador e fibrinolítico, no qual a coagulação, a adesão plaquetária, a ativação e a inflamação, assim como a ativação leucocitária estão suprimidas. A superfície endotelial não-trombogênica é mantida por meio de diversos mecanismos, incluindo: (1) produção endotelial de trombospondina (TM) e subsequente ativação da proteína C; (2) expressão de heparan sulfato e dermatan sulfato que aceleram a atividade anti-trombínica e de co-fator da heparina; (3) expressão constitutiva do inibidor do fator tecidual (TFPI); (4) produção local do ativador de plasminogênio tecidual (tPA) e ativador tipo uroquinase do plasminogênio (uPA). Além disso, a produção de óxido nítrico (NO), prostaciclina e interleucina-10 (IL-10) pelo endotélio inibe a adesão e a ativação dos leucócitos e produz vasodilatação (WAKEFIELD et al., 2008 e BECKER et al., 2000). Sabe-se também que a ativação do endotélio vascular promove o recrutamento, a ativação e adesão de leucócitos, culminando em interações adesivas anormais entre eritrócitos circulantes e leucócitos aderentes, particularmente os neutrófilos polimorfonucleares (JOHNSON e TELEN, 2008; ODIÈVRE et al., 2011).

As células endoteliais expressam moléculas de adesão e produzem outros fatores quimiotáticos frente a estímulos inflamatórios. Na AF, esses estímulos podem ter origens variadas desde citocinas, mediadores lipídicos, hemácias irreversivelmente falcizadas, plaquetas, além da contribuição do heme liberado nos eventos hemolíticos (SONATI e COSTA, 2008; HEBBEL et al., 2004; SETTY et al., 2008; BELCHER et al., 2014). Por exemplo, as plaquetas ativadas liberam trombospondina, que por sua vez promove a aderência das hemácias ao endotélio (STEINBERG, 1999; JAIN et al., 2013). É

possível que as plaquetas participem também de modo mais complexo no processo multicelular da VOC, no qual a sua ativação leva a liberação de proteínas citoaderentes e exposição de fosfolípidios, ou promove a adesão de eritrócitos e leucócitos circulantes ao endotélio vascular, por meio de um mecanismo que consiste na ligação entre os diferentes tipos celulares (CHIANG e FRENETTE, 2005). Estudos apontam que há aumento nos eventos tromboembólicos e alterações no sistema hemostático na AF, em pacientes dentro e fora de crise. Portanto, pode-se sugerir que perturbações no sistema hemostático contribuem com a fisiopatologia da AF (PAKBAZ e WUN, 2014).

O microambiente vascular se torna, portanto, inflamado cronicamente, estabelecendo dessa forma o denominador comum na origem dos sintomas clínicos. A resposta inflamatória persistente pode surgir da falha ou ineficiência dos mecanismos normalmente responsáveis pela resolução da inflamação e restituição da homeostase do tecido (CONRAN et al., 2007). O estado pró-inflamatório crônico é propagado por níveis elevados de citocinas, incluindo interleucina 1 (IL-1), fator de necrose tumoral- α (TNF- α), endotelina-1 e fator estimulador de colônias granulócito-monócito (GM-CSF), que são secretados pelas células endoteliais ativadas e pelos monócitos (CHIANG e FRENETTE, 2005; CROIZAT, 1994; FRANCIS e HAYWOOD, 1992). De modo geral, os níveis desses mediadores biológicos estão alterados, mesmo em indivíduos com AF no estado-estável da doença; contudo, estão ainda mais elevados no contexto das crises agudas de dor e de VOC (HEBBEL et al., 2004).

Observa-se que o endotélio e estruturas subendoteliais estão alterados pela presença de células endoteliais circulantes (ODIÈVRE et al., 2011; HEBBEL, 2008). Toda interação celular que ocorre é baseada nas moléculas de adesão expressas pelo agregado multicelular heterogênea que pode dar origem a processos vaso-oclusivos. As proteínas endoteliais envolvidas na adesão anormal das células dos pacientes com AF incluem molécula de adesão vascular-1 (VCAM-1), molécula de adesão intercelular-1 (ICAM-1), E-selectina, P-selectina, laminina, trombospondina, fibronectina e a integrina $\alpha V\beta 3$, que interagem com receptores específicos presentes nos eritrócitos e nos leucócitos. Mesmo em pacientes assintomáticos as formas solúveis de VCAM-1, ICAM-1, P-selectina, laminina e trombospondina também estão aumentadas (JOHNSON e TELEN, 2008). Em um modelo murino da DF, no

qual as células endoteliais dos camundongos não expressavam P- e E-selectina, houve recrutamento diminuído dos leucócitos bem como diminuição dos fenômenos VOC; o que sugere que as selectinas expressas pelo endotélio ativado desempenham papel importante na adesão dos leucócitos à parede vascular (TURHAN et al., 2002; SAFAYA et al., 2012). As moléculas de adesão e seus ligantes na superfície de eritrócitos e de células endoteliais e no plasma participam ativamente do processo de adesão dos eritrócitos na AF (COVAS et al., 2004). Em eritrócitos, a integrina $\alpha 4\beta 1$ (VLA-4) e o CD36 (receptor para trombospondina) foram algumas das primeiras moléculas de adesão identificadas (SUGIHARA et al., 1992; JONECKIS et al., 1993; SWERLICK et al., 1993), sendo super-expressas em reticulócitos produzidos prematuramente na medula óssea, como consequência do estresse anêmico (ODIÈVRE et al., 2008).

As hemácias falcizadas são mais aderentes ao endotélio vascular e às proteínas da matriz extracelular que as normais. A aderência ao endotélio é mediada por vários receptores da superfície eritrocitária, incluindo as proteínas molécula de adesão celular basal/antígeno eritrocitário Luteran (BCAM/Lu) (CD239), CD47, CD147, ICAM-4, fosfatidilserina (que, em células normais encontra-se restrita à superfície interna da membrana) (SONATI & COSTA, 2008). A adesão dos eritrócitos SS ao endotélio não é autolimitada porque ela pode desencadear sinais que levam à formação de espécies reativas de oxigênio (ROS) e ativação do fator transcricional NF- κ B. O NF- κ B contribui com a ativação vascular crônica por aumentar as moléculas de adesão, incluindo E-selectina, VCAM-1 e ICAM-1, permitindo outras interações com eritrócitos assim como o recrutamento de leucócitos circulantes (CHIANG e FRENETTE, 2005) (Figura 2).

É possível que não exista um mecanismo único ou mais importante de adesão celular na AF. Desta forma, aceita-se que os mecanismos podem diferir entre os pacientes e entre os órgãos, ao longo do tempo, ou entre os tipos de vasos afetados (HEBBEL et al., 2004).

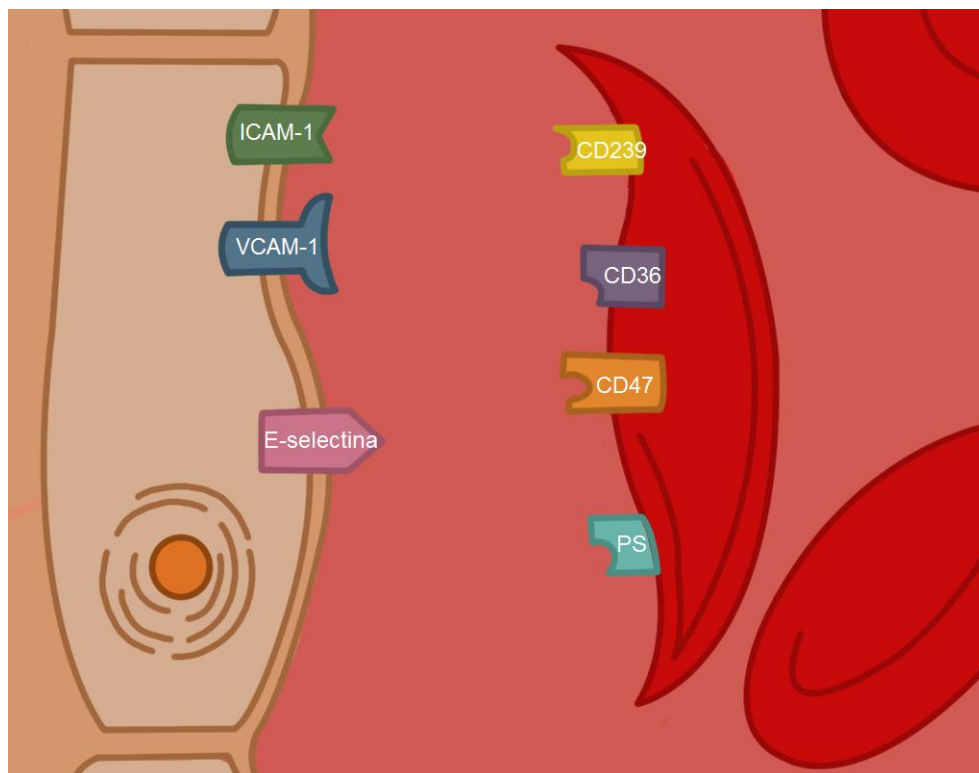


Figura 2. Interações ocorridas entre o eritrócito falcizado e o endotélio vascular pelo aumento da expressão de moléculas de adesão.

Os eventos hemolíticos provocam a liberação da arginase dos eritrócitos, que consome a arginina que é o substrato para a produção de NO pelas células. A redução na biodisponibilidade do NO causa redução da vasodilatação, ativação e proliferação endotelial. Os pacientes com AF exibem um estado de deficiência crônica de NO, que é exacerbado em VOC e em episódios de hemólise (HOPPE, 2014). Tanto a hemólise quanto a perda da função esplênica, que é uma característica da AF, estão associados com danos na membrana dos eritrócitos, com subsequente exposição de fosfatidilserina, ativação do FT e trombose (STEINBERG, 2008), contribuindo com as alterações hemostáticas observadas nos pacientes. O FT é um receptor de superfície celular para o fator VII/VIIa, o iniciador fisiológico da cascata da coagulação, formando um complexo com FVIIa circulante, e ativando o FX com subsequente formação da trombina. Embora o FT não seja constitutivamente expresso no endotélio ou em monócitos *in vivo*, sua expressão pode ser induzida por vários agonistas de relevância fisiopatológica em anemias hemolíticas, incluindo as citocinas inflamatórias IL-1 e TNF- α , hipóxia, força de

cisalhamento (*shear stress*), fatores de crescimento, endotoxina e lesão por reperfusão (SETTY et al., 2008; CAMERER et al., 1996; MAZZOLAI et al., 2002; SOLOVEY et al., 2004).

A anemia crônica e a isquemia tecidual também podem contribuir para a vasculopatia proliferativa via ativação de fatores dependentes do gene *HIF1A* como o gene *NOS2A* (óxido nítrico sintase induzível, iNOS), eritropoietina e fator de crescimento endotelial vascular (STEINBERG, 2008). As óxido-nítrico sintase (NOS) são uma família de enzimas (hemoproteínas semelhantes ao citocromo p-450) responsáveis pela síntese do óxido nítrico a partir de um aminoácido não aromático, L-arginina, e oxigênio molecular (COKIC et al., 2007). O NO é gerado a partir da conversão de L-arginina em L-citrulina pela ação enzimática de uma NO sintase (NOS) dependente de NADPH e oxigênio, que requer tetraidrobiopterina (BH₄), flavina mononucleotídeo (FMN) e flavina adenina dinucleotídeo (FAD) como co-fatores (PALMER et al., 1988; FENG et al., 2011). A isoforma endotelial (eNOS) é constitutivamente expressa e ativada mediante aumento de cálcio intracelular seguido de estimulação celular dependente de receptores como trombina e bradicinina ou independente de receptores como o ionóforo de cálcio (HELLER et al., 1999; BUSSE e MÜLSCH, 1990). Por ser uma hemoproteína um dos passos fundamentais para a produção de NO é a transferência de elétrons do co-fator FMN para o grupamento heme (FENG et al., 2011). Na AF existe grande quantidade de ROS produzidas bem como um ambiente pró-oxidativo constante. Sabe-se que a exposição da eNOS ao peroxinitrito (ONOO⁻), por exemplo, leva a perda da atividade da enzima com concomitante alteração no grupamento heme (CHEN et al., 2010). Por isso, a avaliação da enzima produzida pelas células endoteliais e o perfil de produção de NO constituem aspectos importantes da fisiopatologia vascular da AF a ser estudados.

Os fatores induzidos por hipóxia (HIF-1 α , HIF-1 β e HIF-2 α) são conhecidos por influenciarem a transcrição gênica vascular. A expressão e atividade da subunidade HIF-1 α que forma heterodímeros com HIF-1 β são finamente regulados pela concentração celular de O₂. Em situações de hipóxia, o HIF-1 α ativa a transcrição de genes incluindo eritropoietina, transportadores de glicose, enzimas glicolíticas, fator de crescimento endotelial vascular

(VEGF) e seus receptores (VEGFR1, VEGFR2) e outros genes cujas proteínas aumentam a disponibilidade de O₂ ou facilitam a adaptação metabólica a hipóxia. O HIF também induz a expressão de genes envolvidos no tônus vascular, no crescimento celular e na inflamação (DICHTL, et al., 2003; SEMENZA, 1998). Em células cancerígenas, o HIF- α pode induzir a expressão de diversos genes do metabolismo do ferro, contribuindo com o seu acúmulo por esse tipo celular. Por exemplo, o HIF- α pode induzir a expressão de TfR1 (receptor para transferrina-1), resultando no aumento na internalização do ferro (LOK e PONKA, 1999; TACCHINI et al., 1999). O HIF- α também induz a expressão de HO1 (hemoxigenase-1) que provoca a degradação do heme em monóxido de carbono e biliverdina, o que permite que o ferro seja reciclado (LEE et al., 1997; ZHANG e ZHANG, 2014).

A hipóxia e lesões por isquemia-reperfusão são frequentes na AF. No centro dos mecanismos envolvidos, as células endoteliais são as principais responsáveis pela inflamação observada em resposta aos diversos estímulos presentes no ambiente vascular. As moléculas de adesão, NO e os fatores transcricionais produzidos frente aos estímulos são potenciais alvos terapêuticos a serem estudados na AF. A ativação endotelial pelos produtos da hemólise e em especial pelo heme já foi descrita (BELCHER et al., 2014); porém, a extensão da ativação e sua contribuição para a vasculopatia na AF ainda não foi elucidado.

1.4 HEME E INFLAMAÇÃO

O heme é um complexo de ferro e protoporfirina constituído de quatro anéis pirrólicos unidos por grupamentos “-CH”. Quando o átomo de ferro está no estado ferroso, o complexo formado é chamado de ferroprotoporfirina ou heme, sendo que a molécula é eletricamente neutra (KUMAR e BANDYOPADHYAY, 2005). Uma vez que a molécula do heme contém ferro, ela é bastante hidrofóbica, sendo capaz de entrar rapidamente na membrana celular e aumentar de forma notável a suscetibilidade de morte celular mediada por processos oxidativos (JENEY et al., 2002; BELCHER et al., 2010).

A função do heme é determinada pelas propriedades do polipeptídeo a ele ligado. Por exemplo, na hemoglobina e na mioglobina sua função é a de transportar e armazenar o oxigênio, respectivamente (KUMAR e BANDYOPADHYAY, 2005; DAWSON, 1988). O heme constitui o grupo funcional de diversas proteínas importantes e, portanto, é essencial para vários processos biológicos. Todavia, o heme livre pode ter efeitos prejudiciais, uma vez que catalisa a formação de ROS e, subsequentemente, causa lesão ou disfunção celular (WAGENER et al., 2001; BALLA et al., 1993). Durante a hemólise intravascular, a hemoglobina livre liberada no vaso reage e degrada rapidamente o óxido nítrico (NO), com liberação da arginase no plasma, que é competidor do substrato arginina semelhante à enzima NO sintase (NOS). Esta cadeia de eventos resulta na formação de ROS e vasoconstrição nos pacientes com AF (ROTHER et al., 2005).

Nos tecidos existem respostas variadas aos processos hemolíticos que liberam Hb e heme, e tais respostas dependem de fatores tecido-específicos nos diferentes tipos de leitos vasculares, incluindo heterogeneidade das células endoteliais, nível de hemólise, citocinas, níveis de haptoglobina/hemopexina, atividade da hemoxigenase, infecções e gradiente de O₂ (BELCHER et al., 2014). Todavia, muitas vezes na AF esses mecanismos são pela grande quantidade de Hb e heme descompartimentalizados, além de persistir quadros hemolíticos subclínicos que contribuem para a manutenção do ambiente vascular em estado pró-inflamatório e pró-oxidante.

Quando grandes quantidades de heme livre ou de hemoproteínas se acumulam, os sistemas de detoxificação são sobrecarregados ou não são capazes de reagir adequadamente, fato que permite que o heme exerça o seu efeito nocivo (KUMAR e BANDYOPADHYAY, 2005) (Figura 3).

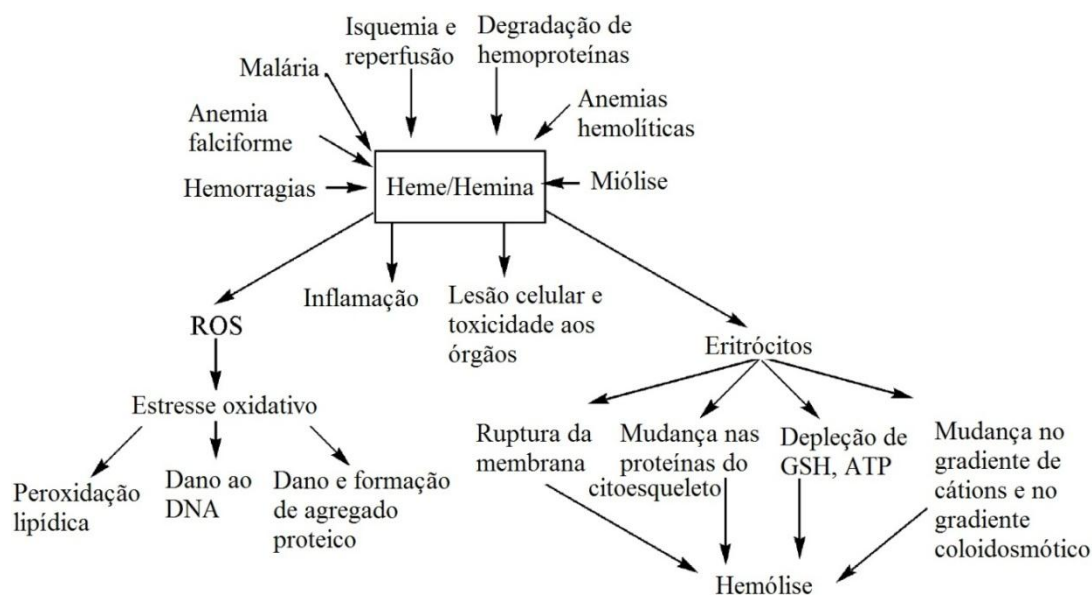


Figura 3. Efeitos tóxicos do heme (KUMAR & BANDYOPADHYAY, 2005).

A AF é caracterizada por eventos frequentes de hemólise crônica, inflamação e coagulação, adesão dos eritrócitos, vaso-oclusão, lesão por isquemia-reperfusão e infarto em órgãos diversos. Durante a hemólise, o heme pode se acumular, oriundo da hemoglobina liberada dos eritrócitos lisados (BELCHER et al., 2014). A sobrecarga de ferro, do mesmo modo que nos processos infecciosos pode contribuir com a biologia da inflamação na AF (HEBBEL et al., 2004). A hemólise na AF, bem como na talassemia- β , também pode ocorrer em função da concentração elevada de heme livre e de sua interação com a membrana dos eritrócitos provocando subsequente dano oxidativo (KUMAR e BANDYOPADHYAY, 2005). A concentração elevada de heme na membrana de eritrócitos falcizados também se correlaciona com o tempo de vida reduzido eritrocitário e com a gravidade da doença (WAGENER et al., 2001; SHAKLAI et al., 1985). Em estudo realizado por Adisa e colaboradores (2013) foi observado que concentrações plasmáticas elevadas de heme estão associadas a VOC e STA.

A natureza altamente instável do ferro é considerada crítica para a habilidade do heme de gerar ROS e causar inflamação. As ROS geradas pelo próprio heme são atribuídas, principalmente, à reação de Fenton (DUTRA et al., 2014) (Figura 4).

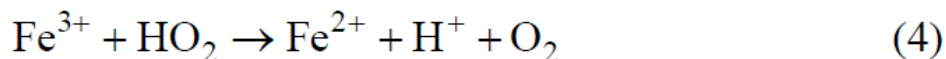
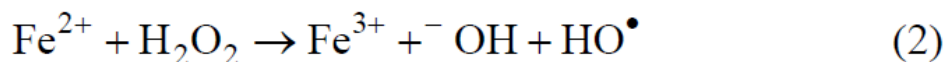
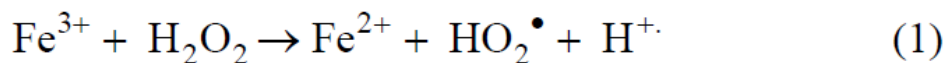


Figura 4. Etapas da produção de radicais livres pela reação de Fenton (ARAÚJO et al., 2011)

Além dos níveis aumentados de hemoglobina livre, os eventos hemolíticos e o estresse oxidativo atuam como redutores de NO e são fatores que contribuem para a diminuição da biodisponibilidade de NO na AF. O superóxido (O_2^-), que é abundante na AF e pode ser gerado pela reação de Fenton, liga-se ao NO para formar o potente peroxinitrito (ONOO^-) e seu conjugado, o ácido peroxinitroso, não apenas contribuindo com a redução da biodisponibilidade e aumento da vasoconstrição, mas também com a exacerbação do estresse oxidativo (NUR et al., 2011; ASLAN et al., 2001; BECKMAN e KOPPEND, 1996).

O heme possui diversas propriedades pró-inflamatórias incluindo a ativação e migração de leucócitos, aumento na expressão de moléculas de adesão e indução de citocinas e proteínas de fase aguda (FIGUEIREDO et al., 2007; GRAÇA-SOUZA et al., 2002; WAGENER et al., 1997). O processo inflamatório é observado em diversas doenças com hemólise excessiva ou dano celular extenso, associado ou não com a presença de agentes infecciosos. Algumas doenças graves têm fenômenos hemolíticos intra ou extravasculares, que constituem aspectos importantes da sua fisiopatologia (FIGUEIREDO et al., 2007). Quantidades elevadas de hemeoproteínas são liberadas durante a hemólise ou rhabdomiólise em diversas condições patológicas, como hemorragias, hematomas, transfusão sanguínea excessiva, lesão muscular grave e hemoglobinopatias (WAGENER et al., 2001; MULLER-EBERHARD et al., 1968; MOORE et al., 1998; GORBUNOV et al., 1997;

LETARTE et al., 1993; HOLT et al., 2000). Além disso, durante lesões por isquemia e reperfusão o heme pode ser liberado do citocromo P450 mitocondrial, e outras hemeproteínas desnaturadas podem contribuir com as modificações inflamatórias e a lesão celular associados ao estresse oxidativo (WAGENER et al., 2001).

Em estudo realizado por Wagener e colaboradores (2001) a administração de heme aos camundongos resultou no aumento da permeabilidade vascular, das moléculas de adesão e do infiltrado leucocitário, que são as características principais do quadro inflamatório agudo presente na AF (WAGENER et al., 2001). O aumento na expressão de moléculas de adesão no endotélio inflamado sugere fortemente que o influxo de leucócitos observado é mediado pela ativação de moléculas de adesão na superfície celular, tais como selectina, fibronectina e ICAM-1 induzidas pelo heme (WAGENER et al., 2001). Os dados mostraram também que o excesso de heme livre vascular é um contribuinte para a inflamação em vários órgãos, em especial para o fígado e o pâncreas dos animais (WAGENER et al., 2001).

A ativação celular é uma etapa fundamental do processo inflamatório, que leva a produção de citocinas, quimiocinas, mediadores lipídicos e ROS. Diversos tipos celulares contribuem diretamente com a resposta inflamatória na AF, em especial os leucócitos, hemácias, plaquetas e o endotélio vascular. O modo como os monócitos são ativados na AF ainda precisa ser completamente elucidado. Existem diversos mecanismos propostos como o aumento da fagocitose de eritrócitos senescentes, as micropartículas liberadas pelas hemácias, ou a própria ativação de monócitos pelo endotélio ativado. Além disso, é possível que os produtos da hemólise também possam provocar respostas inflamatórias dessas células (BELCHER et al., 2000). Em outro estudo, foi demonstrado que além da ativação endotelial os leucócitos também foram ativados após exposição ao heme, o que ressalta seu potencial pró-inflamatório (WAGENER ET AL., 2001). Sugere-se que o heme seja capaz de ativar macrófagos teciduais a produzirem leucotrieno B₄ (LTB₄), que por sua vez aumenta a quimiotaxia de neutrófilos (MONTEIRO et al., 2011). É possível também que o heme atue sobre os neutrófilos retardando a apoptose destas células (ARRUDA et al., 2004). O prolongamento no tempo de vida dos

neutrófilos poderia ser um fator prejudicial na AF. A interação do heme livre com os neutrófilos leva a reorganização do citoesqueleto, produção de ROS pela indução da proteína quinase C (PKC) e também aumento na produção de interleucina-8 (IL-8) (ARRUDA et al., 2004; GRAÇA-SOUZA et al., 2002). Além da atuação nos leucócitos, o heme também ativa o endotélio vascular, fato que se reflete pelo aumento de moléculas de adesão como a ICAM-1, VCAM-1 e E-selectina (WAGENER et al., 1997); aumento na expressão de fator tecidual (FT) (SETTY et al., 2008); mobilização dos corpúsculos de Weibel-Palade e aumento na produção de fator de von Willebrand (BELCHER et al., 2014). O heme liberado da metahemoglobina catalisa a oxidação de lipoproteínas de baixa densidade (LDL), que por sua vez induz citólise endotelial primária causada por hidroperóxidos de lipídios. Como defesa contra tal toxicidade, as células normais aumentam a produção das moléculas citoprotetoras de heme-oxigenase 1 e ferritina (JENEY et al., 2002).

O heme influencia o processo inflamatório ao induzir a ativação do complexo proteico do inflamassoma. Desta forma, foi observado *in vivo* que a hemólise causa a ativação do inflamassoma por meio da proteína *NOD-like receptor family, pyrin domain containing 3* (NLRP3) e a secreção de interleucina-1 β (IL-1 β) por macrófagos peritoneais (DUTRA et al., 2014). Desse modo é possível identificar o efeito imunomodulatório do heme, ao contribuir fortemente com o processo inflamatório e a vasculopatia na AF.

1.5 HIDROXIURÉIA

A hidroxiuréia (HU) é um agente citostático usado para o tratamento de diversas doenças mieloproliferativas (policitemia vera, trombocitopenia essencial e mielofibrose) neoplásicas e não hematológicas (como HIV). A HU exerce seu papel citostático pela inibição da ribonucleotídeo redutase, parando a divisão celular na fase S (LOPES et al., 2014; ATWEH e LOUKOPOULOS, 2001; KOVACIC, 2011).

Os efeitos benéficos da concentração elevada de HbF na AF estimularam a realização de estudos visando determinar se a HU utilizada no

tratamento poderia aumentar a HbF e, desse modo, promover a melhoria clínica dos pacientes com AF (CHARACHE et al., 1995). O tratamento com HU reduz as manifestações clínicas da AF, bem como a frequência e a gravidade das crises dolorosas, e aumenta as concentrações de HbF em um número significativo dos pacientes. Os mecanismos pelos quais a HU produz seu efeito não são completamente elucidados, embora o aumento na concentração de HbF induzida pela HU e da porcentagem de eritrócitos que possuem HbF (células F) são geralmente aceitas como as modificações mais importantes para o efeito benéfico da droga (COVAS et al., 2004).

Embora inicialmente tenha sido pensado que a HU desenvolve seu efeito benéfico pelo aumento da síntese de HbF, contribuindo para a diminuição da falcização, foi sugerido que um dos mecanismos pelos quais a HU age consiste em diminuir também a adesão dos eritrócitos, o que resultaria na diminuição da VOC (JOHNSON e TELEN, 2008). Estudos posteriores mostraram que o uso de HU leva a redução na contagem de neutrófilos, monócitos e reticulócitos (CHARACHE et al., 1996), além do aumento discreto na concentração de hemoglobina total (STEINBERG, 1999). Outros efeitos vantajosos do uso de HU são: (1) Os eritrócitos que contém HbS tornam-se menos densos; (2) A hemólise também é diminuída; (3) A contagem total de reticulócitos de “estresse” diminui em pacientes com AF ou com hemoglobinopatia SC (HbSC) sob tratamento; (4) Na maioria dos pacientes as crises dolorosas diminuíram ou desapareceram, e houve redução na frequência de internações. A principal consequência do tratamento pode ser atribuída também à interrupção precoce do processo VOC, que pode prevenir danos ao sistema nervoso central (SNC), pulmões, rins e ossos (STEINBERG, 1999; SONATI e COSTA, 2008).

É possível prever razoavelmente quais pacientes irão responder ao tratamento com a HU. Adultos com contagens elevadas de neutrófilos e reticulócitos e com amplo tratamento associado exibiram diminuição na contagem destas células e aumento na produção de HbF. O tratamento com a HU deve ser reservado a pacientes que tiveram complicações e que sejam graves o suficiente para justificar a carga do tratamento e que consigam obedecer ao regime adequadamente. O equilíbrio entre a toxicidade hematológica (indicada pela redução no número de neutrófilos ou plaquetas) e

o aumento na HbF determinam a dose ótima de HU. Até a dose estável ser atingida, os pacientes com AF devem ser monitorados a cada duas semanas pelo hemograma. Quando a dose é atingida, o leucograma deve ser realizado a cada quatro ou seis semanas para prevenir complicações ocasionais (STEINBERG, 1999).

Em relação aos efeitos adversos, a leucemia aguda pode se desenvolver em cerca de 5-10% dos pacientes com policitemia vera – uma doença neoplásica mieloproliferativa – tratados com HU (STEINBERG, 1999). Contudo, apesar dos efeitos adversos serem apresentados por diversos pacientes, não foi verificado risco de desenvolvimento de neoplasias apesar do longo tratamento (STEINBERG, 2008).

1.6 ESTATINAS

As estatinas (inibidoras da 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima-A redutase) estão entre as drogas mais prescritas no mundo e são utilizadas, principalmente, para controlar os níveis de colesterol em doenças cardíacas. As estatinas inibem a síntese de colesterol celular, o que provoca o aumento na expressão dos receptores para o LDL em hepatócitos, como mecanismo compensatório para a internalização da molécula. Dessa forma, a droga atua reduzindo os níveis plasmáticos de colesterol (ROSCH et al., 2010; COLLINA et al., 2002).

As estatinas são drogas anfipáticas. Elas podem entrar nas células diretamente por interações com as membranas no caso das lipofílicas (sinvastatina, fluvastatina e atorvastatina) ou por interação com proteínas carreadoras no caso das hidrofílicas, como a pravastatina. Já a rosuvastatina apresenta comportamento intermediário. A maioria das estatinas, exceto a pravastatina e parcialmente a rosuvastatina, apresenta metabolismo de primeira passagem no fígado, sendo que a biodisponibilidade sistêmica é em torno de 5-30% dependendo da dose administrada. A maioria dos metabólitos é farmacologicamente ativo, com exceção mais uma vez da pravastatina e da fluvastatina. As estatinas são predominantemente metabolizadas pelo

citocromo p-450 (CYP), com exceção da pravastatina e a rosuvastatina, que são hidrofílicas e passam por menos processos metabólicos (SIRTORI, 2014).

As estatinas possuem amplitude elevada de efeitos biológicos e, independente de causar redução no nível dos lipídios, são benéficas na AF. As estatinas são anti-inflamatórias, aumentam a expressão de eNOS, aumentam a biodisponibilidade de NO, inibem a expressão endotelial de FT, e têm efeitos antiproliferativos (HEBBEL et al., 2004; KALINOWSKI et al., 2002; KOH, K. K., 2000; VEILLARD e MARCH, 2002). As propriedades anti-inflamatórias das estatinas abrangem a redução na expressão de moléculas de adesão, redução das proteínas quimioatraentes, redução de enzimas pró-inflamatórias e redução de marcadores séricos de inflamação (BLANCO-COLIO et al., 2003).

Os mecanismos que produzem a vasculopatia na AF são muito semelhantes aos ocorridos nos eventos ateroscleróticos iniciais, com exceção da deposição de lipídios, todos os outros processos são comuns (HOPPE et al., 2011). Na aterogênese ocorre adesão dos monócitos ao endotélio vascular, ativação destes monócitos, redução na biodisponibilidade de NO e aumento na expressão de moléculas de adesão no endotélio, o que perpetua o processo (BLANCO-COLIO et al., 2003). Danos similares ao que são observados em pacientes com lesões vasculares ateroscleróticas também são frequentes em pacientes com AF com lesões nos grandes vasos do cérebro, incluindo hiperplasia da camada íntima, e proliferação de fibroblastos e células de músculo liso (JOHNSON e TELEN, 2008). Em estudos com AF a sinvastatina reduziu a ativação endotelial pela modulação das integrinas $\beta 2$ *macrophage-1 antigen* (Mac-1), *lymphocyte function associated-1* (LFA-1) e *very-late antigen 4* (VLA-4). A redução na expressão dessas moléculas de adesão reduziu, conseqüentemente, a adesão dos neutrófilos de pacientes com AF ao endotélio vascular em modelo *in vitro* (CANALLI et al., 2011). Já em estudo piloto para avaliar o uso de sinvastatina por curto período de tempo por pacientes com AF foi possível verificar que houve redução significativa nos níveis de interleucina-6 (IL-6) e proteína C reativa (PCR) e aumento plasmático de NO nos pacientes que receberam o tratamento (HOPPE et al., 2011), demonstrando a atividade anti-inflamatória.

1.7 ÁCIDO ASCÓRBICO

O ácido ascórbico é o antioxidante hidrossolúvel mais importante no plasma humano. A molécula eficientemente remove superóxido e outras ROS e protege os lipídios da peroxidação, característica que o torna importante no microambiente oxidativo da AF. Acredita-se que o ácido ascórbico desempenha função protetora na aterogênese, uma vez que estudos epidemiológicos mostram que a concentração plasmática do antioxidante é inversamente proporcional a morte por doenças coronarianas (HELLER et al., 1999; FREI et al., 1989; SOM et al., 1983; RETSKY et al., 1993; WEBER et al., 1996). As células humanas não possuem gulonolactona-oxidase e, portanto, não podem sintetizar o ascorbato. Por isso, o ascorbato plasmático é oriundo exclusivamente da dieta (VISSERS et al., 2007; BANHEGYI et al., 1997).

O ascorbato penetra nas células dos mamíferos por transportadores específicos (SVCT1 e SVCT2), em processo regulado pelo gradiente eletroquímico de sódio (TSUKAGUCHI et al., 1999). Porém, a forma oxidada do ascorbato, deidroascorbato (DHA), é transportada pelas células mais rápido do que a forma reduzida, por meio das várias isoformas dos transportadores de glicose (GLUT). Uma vez dentro das células o DHA é reduzido novamente por mecanismos enzimáticos, contribuindo com o acúmulo intracelular da forma reduzida. Esse processo de reciclagem permite que vários tecidos acumulem concentrações na ordem de milimolar. No entanto, ainda não está completamente elucidado qual dos dois mecanismos de transporte é predominante *in vivo* (DUARTE e LUNEC, 2005; VERA et al., 1993; WELCH et al., 1995; RUMSEY et al., 1997).

Entre as classes de antioxidantes, os removedores de oxigênio são os compostos que atuam capturando o oxigênio presente no meio, tornam-se estáveis por reações químicas e, conseqüentemente, indisponíveis para atuarem como propagadores da autoxidação. O ácido ascórbico, seus isômeros e seus derivados são os melhores exemplos deste grupo. O ácido ascórbico pode atuar também de forma sinérgica na regeneração de antioxidantes primários (RAMALHO e JORGE, 2005; MONTECINOS et al., 2007). O efeito protetor vascular do ácido ascórbico tem sido atribuído a sua propriedade de remover os radicais livres que podem levar a proteção do NO

da inativação pelo ânion superóxido e por aumentar a biodisponibilidade do NO (HELLER et al., 1999).

Por outro lado, estudos *in vitro* demonstraram que a vitamina C na presença de metais de transição, tais como o ferro, pode atuar como uma molécula pró-oxidante e gerar os radicais H_2O_2 e OH^\cdot (RAMALHO e JORGE, 2005; GIULIVI e CADENAS, 1993). A vitamina C pode contribuir com o dano oxidativo pela redução do ferro férrico Fe^{3+} em ferro ferroso Fe^{2+} , que pode então reduzir o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em radical hidroxila. De modo geral, essas reações devem ser controladas *in vivo* uma vez que existem mecanismos para regular o ferro livre, como a ferritina e a transferrina. Conseqüentemente, é discutível se os efeitos pró-oxidantes do ácido ascórbico são relevantes no corpo humano (HALLIWELL, 1999; CARR e FREI, 1999). Ainda assim, a suplementação da dieta com vitamina C não é recomendada para pessoas com níveis elevados de ferro sérico ou em patologias associadas com sobrecarga de ferro, como as talassemias e a hemocromatose (HERBERT et al., 1996; DUARTE e LUNEC, 2005).

Quando a produção de ROS supera os antioxidantes celulares, as células sofrem estresse oxidativo (DUARTE e LUNEC, 2005). Biomarcadores de estresse oxidativo na AF são úteis para identificar pacientes de alto risco para danos oxidativos e também para avaliar terapias antioxidantes como suplementação com zinco, vitamina C, vitamina E e N-acetilcisteína (REES e GIBSON, 2011; NUR et al., 2011). Entretanto, é necessário considerar que a AF é um tipo de anemia hemolítica, e, portanto, a interação entre o ácido ascórbico, o ferro livre e o ambiente inflamatório da AF deve ser feita de maneira cautelosa. É importante considerar que os pacientes sofrem estresse oxidativo de maneira sistêmica e crônica, desse modo, abordagens terapêuticas antioxidantes devem ser avaliadas minuciosamente.

Com base nas alterações vasculares presentes nos pacientes com AF, julgamos importante o desenvolvimento do presente estudo, onde testaremos o ambiente vascular representado pelas células HUVEC, frente a um ambiente exposto a concentrações diferenciadas de heme, simulando o ambiente hemolítico presente na AF, com a finalidade de avaliar a resposta a diferentes tratamentos.

2 JUSTIFICATIVA

A AF é uma doença com características clínicas heterogêneas, apesar de ser atribuída a uma causa genética única comum a todos os pacientes. Sabe-se que há um subfenótipo de pacientes com taxa elevada de hemólise, que apresentam risco elevado para complicações vasculares, como hipertensão pulmonar, úlceras de perna, priapismo e, possivelmente, doença cerebrovascular (REES e GIBSON, 2011; KATO et al., 2007). A principal abordagem terapêutica utilizada em pacientes com AF tem como objetivo aumentar os níveis de HbF, sendo que a única droga disponível oficialmente para o tratamento da AF é a HU (MALUF et al., 2009; KOVACIC, 2011). Apesar de ser verificada melhora no quadro clínico geral dos pacientes, por exemplo, diminuindo a quantidade de leucócitos, reduzindo o risco de AVC, outros processos inflamatórios que são desencadeados pela inflamação crônica também merecem atenção. Produtos inflamatórios como ROS, citocinas e mediadores lipídicos permanecem elevados no plasma dos pacientes, mesmo em pacientes fora de crise (LANARO et al., 2009; VILAS-BOAS et al., 2010; CERQUEIRA et al., 2010; CAJADO et al., 2010), e nem sempre o tratamento exclusivo com HU é capaz de melhorar os sintomas subclínicos que são persistentes em alguns pacientes. Um dos estudos não demonstrou a existência de correlação entre o aumento na síntese de HbF e os benefícios clínicos nos pacientes que receberam tratamento com HU (ATWEH & LOUKOPOULOS, 2001; CHARACHE et al., 1996), o que corrobora a hipótese de que a melhoria clínica do paciente e o aumento de HbF nem sempre ocorrem simultaneamente (RUPON et al., 2000; CHARACHE, 1997).

Além disso, diversos efeitos colaterais são identificados em pacientes com AF em uso de HU. O tratamento com a HU reduz a frequência das crises de dor, complicações pulmonares e hospitalização; apesar disso, nem todos os pacientes respondem ao tratamento, e alguns podem apresentar falência progressiva de órgãos (VICHINSKY, 2002). Desta forma, a droga pode induzir efeitos colaterais e adversos, como depressão da medula óssea, manifestações cutâneas e gastrintestinais e, eventualmente, alopecia e distúrbios neurológicos (BENZ, 1996; GOLDEBERG et al., 1992; PLATT et al.,

1994; ROGERS, 1997). Em estudo realizado por Ghasemi e colaboradores (2014) foram identificadas como efeitos colaterais principais observados em pacientes com AF e β -talassemia tratados com HU, as alterações dermatológicas (39,28%), neurológicas (23,2%), gastrointestinais (17,5%) e hematológicas (10,71%). Em nível celular a HU pode também exercer toxicidade aos ácidos nucléicos, em especial ao DNA. Em estudo realizado por Maluf e colaboradores (2009), foi observado que pacientes com AF em tratamento há mais de 6 meses com HU exibem o aumento na formação de micronúcleos nos leucócitos do sangue periférico, o que foi correlacionado positivamente com o tempo de tratamento. Pode-se especular que um dos mecanismos de toxicidade da HU seja a redução dos *pools* de desoxirribonucleosídeos trifosfatos (dNTP) intracelulares como resultado da inibição da ribonucleotídeo redutase, que reduz os mecanismos de reparo do DNA pela diminuição de nucleotídeos disponíveis para a DNA polimerase (MALUF et al., 2009). Já outros estudos indicam que a HU induz a produção de radicais livres que podem ser citotóxicos para as células. O efeito citotóxico é mais proeminente na membrana celular e os danos em membranas de eritrócitos e granulócitos parecem ser mediados pelos ataques dos radicais (KOVACIC, 2011; PRZYBYSZEWSKI & KASPERCZYK, 2006).

Apesar de melhorar o quadro clínico geral dos pacientes com AF, a HU não deve ser pensada como tratamento exclusivo, uma vez que o processo inflamatório crônico da doença é persistente. Portanto, a busca por novas abordagens terapêuticas que sejam capazes de prevenir a adesão eritrocitária e leucocitária ao endotélio de pequenos vasos e capilares, reduzir os metabólitos pró-inflamatórios e terapias antioxidantes são essenciais para promover melhora clínica nos pacientes. Deste modo, a avaliação de tratamentos que sejam capazes de beneficiar o curso clínico dos pacientes é necessária, com o objetivo de identificar drogas com potencial para tratamento dos processos colaterais que ocorrem subjacentes à doença principal.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o perfil de ativação endotelial *in vitro* em modelo com células HUVEC mediante estímulo com heme em associação com abordagens terapêuticas que possuem diferentes mecanismos de ação.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a produção do fator tecidual pelas endoteliais estimuladas pelo heme e tratadas com sinvastatina, hidroxiuréia e ácido ascórbico;
- Avaliar a produção indireta de óxido nítrico pelas células estimuladas com heme e tratadas com as drogas;
- Estudar o perfil de produção da enzima óxido nítrico sintase endotelial nas culturas celulares;
- Verificar o efeito do heme e das drogas na produção do fator transcricional HIF- α .

4 MÉTODOS

4.1. CULTURA DE CÉLULAS ENDOTELIAIS

As células HUVEC (*Human umbilical vein endothelial cells*) de linhagem imortalizada foram cultivadas em meio RPMI 1640 (Gibco, Nova Iorque, NY, USA), em pH 7,3, suplementado com 10% de soro bovino fetal (Gibco, Nova Iorque, NY, USA), 1% de glutamina e Hepes, 0,1% de bicarbonato de sódio e penicilina e estreptomicina (10U/mL e 10 µg/mL, respectivamente) (Gibco, Nova Iorque, NY, USA), em garrafas de 25cm², e mantidas em estufa úmida a 37°C, em atmosfera de 5% de CO₂. O meio de cultura foi trocado a cada três dias e as células foram utilizadas até a 5ª passagem. Este tipo celular é amplamente utilizado em experimentos para avaliar angiogênese (LOPES et al., 2014), adesão leucocitária (CANALLI et al., 2011), alterações hemostáticas (SETTY et al., 2008) e ativação endotelial vascular (BELCHER et al., 2014; WAGENER et al., 1997). Por este motivo as escolhemos para conduzir os ensaios do presente trabalho.

Para os ensaios, ou para a manutenção da cultura, quando as células atingiam confluência de aproximadamente 80% nas garrafas, estas eram lavadas três vezes com 3 mL de tampão PBS 1X (estéril e em temperatura ambiente). Após a última lavagem, o tampão era descartado e em seguida eram adicionados 2mL de Tripsina 0,25% EDTA 1X (Gibco, Nova Iorque, NY, USA) seguido de incubação durante 5 minutos a 37°C em estufa com 5% de CO₂ e umidade. Após este período, volume igual ou o dobro de meio completo (com soro) foi adicionado às garrafas para inativar a Tripsina. Para os ensaios foi realizada a contagem das células utilizando o azul de Tripán em câmara de Neubauer e inoculadas em placas de 96 ou 24 poços. Para a manutenção da cultura as células foram redistribuídas em garrafas novas.

4.2. ENSAIOS DE ATIVAÇÃO CELULAR

Com o propósito de avaliar os efeitos do estímulo (heme) e dos tratamentos (sinvastatina, HU e ácido ascórbico) no endotélio vascular *in vitro*, as células previamente cultivadas em garrafas foram tripsinizadas e recultivadas em placas de 96 poços, com 2×10^4 células/mL em cada poço. Este modelo foi utilizado nos experimentos cuja metodologia consiste em dosagens no sobrenadante. Para os experimentos que necessitaram lise das células, a HUVEC foi cultivada em placas de 24 poços, com 2×10^5 células/mL.

Para isso, as células foram descoladas das garrafas de cultura onde eram mantidas utilizando tripsina, como descrito anteriormente. As suspensões celulares foram coletadas em tubo cônico de 15mL e centrifugadas a 600 rpm por 5 minutos em temperatura ambiente. Após a centrifugação o sobrenadante foi descartado e o concentrado de células homogeneizado em RPMI completo, para proceder a contagem em câmara de Neubauer. A contagem foi realizada usando azul de Tripán 0,2% em PBS1X para excluir as células não viáveis.

Primeiro procedeu-se a cultura das células nos poços com meio RPMI completo suplementado com soro fetal bovino por 24 horas nas placas, para permitir que as células aderissem adequadamente e formassem a monocamada característica. Após 24 horas de cultivo, o meio RPMI completo foi trocado e os estímulos foram adicionados nas concentrações indicadas (Figura 5).

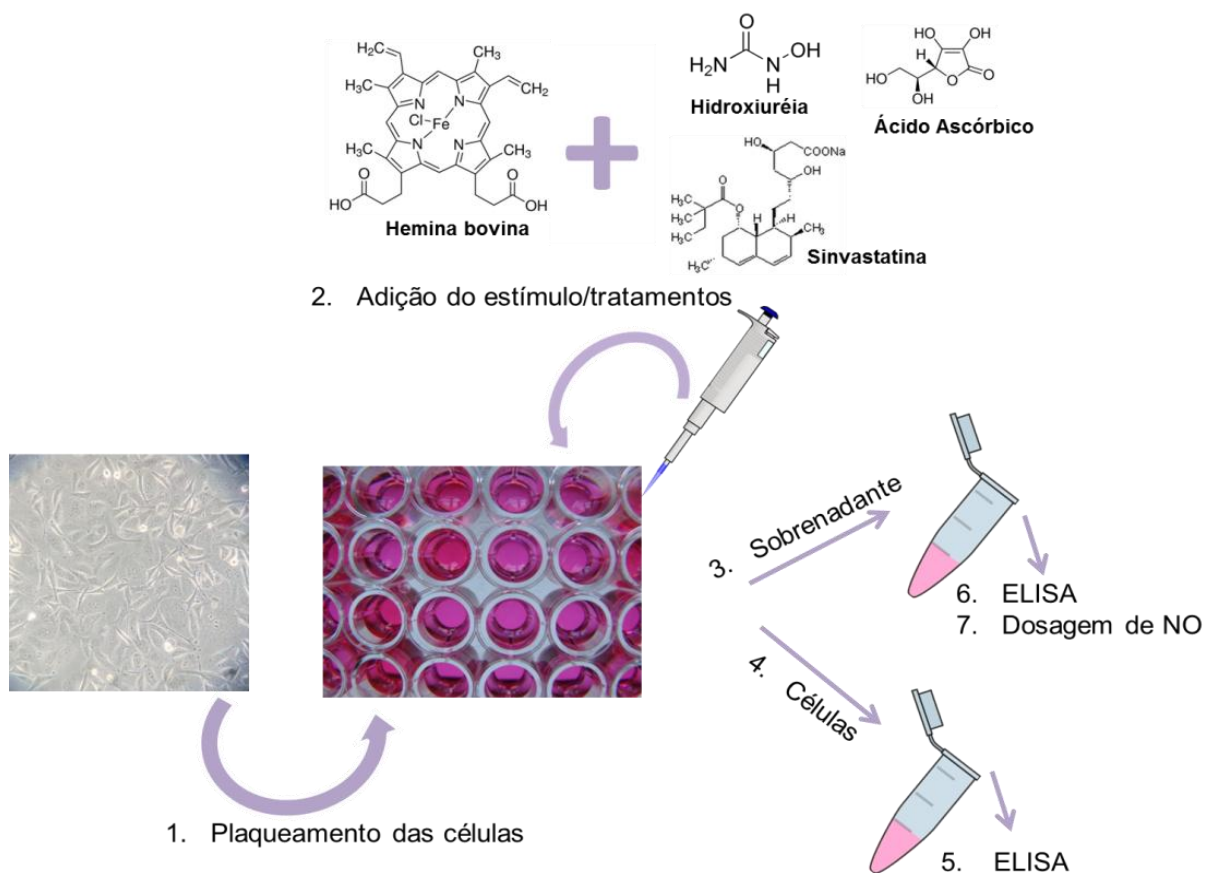


Figura 5. Desenho experimental dos ensaios de ativação celular *in vitro* em modelo de endotélio vascular com células HUVEC.

Cada cultivo consistiu em uma condição experimental avaliada posteriormente. Todos os cultivos foram realizados em estufa a 37°C, em atmosfera de 5% de CO₂. Após estímulo *overnight* (de 18 a 20 horas de incubação), o sobrenadante das placas foi coletado e distribuído de maneira asséptica em fluxo laminar e armazenado em freezer -80°C para análises subsequentes. Os experimentos que necessitaram de material celular lisado foram feitos imediatamente após a lise das células.

4.3. PREPARO DAS DROGAS

4.3.1. Heme

A solução estoque de hemina bovina (Sigma, St. Louis, MO, USA) foi feita na concentração de 5mM utilizando 20% do volume de NaOH (0,1N diluído em água apirogênica) e 80% de RPMI base. Após adicionar a base forte, a solução foi homogeneizada durante 5 minutos em vórtex, esse procedimento foi repetido após a adição do RPMI. A diluição foi feita ao abrigo da luz para evitar a produção de radicais livres e a solução estoque sempre foi preparada no dia do experimento. Para assegurar que não houve contaminação com LPS, todas as soluções foram preparadas antes do uso, utilizando meio de cultura ou água apirogênica como solvente. A partir da solução estoque, diluições foram feitas diretamente em cada poço das placas, com o objetivo de obter concentrações similares às que são observadas laboratorialmente em pacientes com AF e voluntários sadios. Em estudo realizado em nosso laboratório, foi verificado que a concentração plasmática de heme em indivíduos sadios é de 28,5 μ M, e nos pacientes é de 43 μ M em HbSC, 68,6 μ M em HbSS e em DF (HbSC + HbSS) é de 54,6 μ M (SEIXAS et al., 2014, em preparação). Dessa forma, as concentrações utilizadas nos ensaios foram de 30, 50 e 70 μ M de heme.

4.3.2. Hidroxiuréia

A HU (Sigma, St. Louis, MO, USA) foi homogeneizada em RPMI base, obtendo uma solução estoque de 10mM. As diluições subsequentes em concentrações semelhantes às concentrações plasmáticas foram feitas nos poços da placa de cultura, em RPMI completo. Em pacientes com AF, a partir da dose terapêutica instituída as concentrações podem variar de 50 a 250 μ M de HU (LOPES et al., 2014; CHARACHE et al., 1992). Por isso, as concentrações escolhidas para os ensaios foram 50, 100 e 200 μ M.

4.3.3 Sinvastatina Sódica

A sinvastatina sódica (Calbiochem, Darmstadt, Alemanha) foi solubilizada em etanol P.A. para obtenção de solução estoque a 10mM, alíquotada e armazenada a -70°C. Para cada ensaio, uma alíquota foi diluída novamente em RPMI base para obter novo estoque de 100µM, a partir desse estoque diluições subsequentes nas concentrações de 0,1µM, 1µM e 5µM foram feitas. Tais concentrações são semelhantes às concentrações encontradas na literatura em ensaios com células endoteliais vasculares (CANALLI et al., 2011; KUREISHI et al., 2000; ZHU et al., 2008).

4.3.4 Ácido Ascórbico

O ácido L-ascórbico (Sigma, St. Louis, MO, USA) foi empregado nos ensaios. Uma solução estoque foi preparada na concentração de 3mM em meio RPMI base como diluente. A solução foi preparada no dia do experimento ao abrigo da luz, para evitar a degradação precoce do ácido ascórbico. A partir do estoque, as diluições subsequentes foram feitas nos poços da placa de cultura em RPMI completo nas concentrações de 30µM, 60µM e 120µM. As concentrações utilizadas nos ensaios foram baseadas em concentrações próximas as que correspondem a capacidade de internalização da vitamina pelas células HUVEC (HELLER et al., 1999), e também das doses terapêuticas (MONTECINOS et al., 2007; LINSTER e SCHAFTINGEN, 2007).

4.4 ELISA PARA FATOR TECIDUAL/FATOR III DA COAGULAÇÃO

O perfil de produção do FT foi avaliado pela técnica de ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*). O sobrenadante das culturas foi submetido ao ensaio utilizando o kit da marca R&D Systems (Minneapolis, MN, USA) (ELISA sanduíche) para detectar o fator III da coagulação (fator tecidual).

As placas foram sensibilizadas *overnight* com 4µg/mL do anticorpo de captura diluído em PBS 1X. Após a incubação, as placas foram bloqueadas

com PBS1X e BSA a 1%, por 1h30 em temperatura ambiente. Após o bloqueio, as amostras e a curva padrão (com maior concentração 500pg/mL) foram adicionadas e incubadas por mais 2 horas em temperatura ambiente. O anticorpo de detecção (200ng/mL em PBS 1X e BSA1%) foi adicionado e após mais 2 horas de incubação, a estreptavidina (diluída 1:200 em PBS 1X e BSA) foi incubada por 20 minutos em temperatura ambiente ao abrigo da luz. Por fim, a solução substrato (1:1 de H₂O₂ e tetrametilbenzidina) foi adicionada e após mais 20 minutos de incubação em temperatura ambiente ao abrigo da luz, a reação foi interrompida com a solução de parada (2N H₂SO₄). A densidade óptica foi determinada em comprimento de onda de 450nm em espectrofotômetro. Os resultados foram obtidos com o *software* SoftMax Pro e expressos em picogramas por mililitro.

4.5 ELFIA PARA FATOR INDUZÍVEL POR HIPÓXIA- A (HIF-A) TOTAL

O fator de transcrição HIF- α foi avaliado nos cultivos empregando o kit *Cell-Based ELISA Human/Mouse Total HIF-1 α Immunoassay* (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA), através da metodologia de ELFIA (*Enzyme Linked Fluorescent Immuno Assay*). Na placa de 96 poços fornecida pelo kit, 2x10⁴ células/mL foi adicionado em cada poço. O desenho experimental foi idêntico ao dos ensaios de ativação celular, utilizando as mesmas concentrações das drogas e as mesmas combinações.

Após os estímulos *overnight* (de 18 a 20 horas de incubação) o sobrenadante da cultura foi coletado e distribuído em fluxo laminar de maneira asséptica para quantificações posteriores. As células foram fixadas na placa com solução de formaldeído a 4% em PBS 1X e incubadas durante 20 minutos em temperatura ambiente. Uma vez que as células foram fixadas na placa, o tampão *quenching* (0,6% H₂O₂ no tampão de lavagem do kit) foi adicionado por 20 minutos a temperatura ambiente. Após este passo, os poços foram bloqueados com o tampão de bloqueio do kit por 1 hora em temperatura ambiente. Depois do bloqueio, a mistura de anticorpos primários (1:1 de anticorpo anti-citocromo c e anticorpo anti-HIF- α em tampão de bloqueio) foi incubado *overnight* a 4°C. Seguindo a primeira marcação, a mistura de

anticorpos secundários (1:1 dos anticorpos conjugados) foi adicionada e a placa foi incubada 2 horas em temperatura ambiente. Em seguida, o substrato F1 foi adicionado e incubado por 40 minutos, seguido do substrato F2 incubado por mais 40 minutos. A fluorescência foi verificada primeiro com excitação a 540nm e emissão a 600nm, logo depois com excitação a 360nm e emissão a 450nm. Os resultados foram expressos como unidade relativa de fluorescência (RFU).

4.6 ELISA PARA ÓXIDO NÍTRICO SINTASE ENDOTELIAL (ENOS)

A avaliação da enzima óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) foi feita utilizando o kit *Quantikine Human eNOS* da R&D Systems (Minneapolis, MN, USA). As células foram cultivadas em placas de 24 poços. O sobrenadante foi coletado, as células foram descoladas das placas utilizando tripsina, lavadas duas vezes com tampão PBS 1X (estéril e em temperatura ambiente) antes de serem lisadas com o tampão de lise do kit (1mL a cada 10^6 células), no gelo. As células foram centrifugadas (300 x g por 5 minutos), o sobrenadante foi descartado e o lisado celular foi utilizado imediatamente. Na placa foram adicionados 100µL do diluente RD1W em cada poço, e mais 100µL da curva padrão, amostras e controle, incubados por 2 horas em temperatura ambiente. Após o período de incubação, a placa foi lavada com 400µL do tampão de lavagem em cada poço, três vezes. Ao final da última lavagem, a placa foi seca completamente invertendo-a contra papel absorvente. Duzentos microlitros (200µL) do conjugado eNOS foram adicionado em cada poço e incubados por mais 2 horas em temperatura ambiente. A placa foi lavada novamente, e a solução de substrato foi incubada por 30 minutos ao abrigo da luz, a solução de parada foi adicionada e a densidade óptica foi determinada em comprimento de onda de 450 nm. Os resultados foram expressos em pg/mL.

4.7 DOSAGEM DE ÓXIDO NÍTRICO (NO)

A produção de nitrito pelas células HUVEC foi também avaliada no sobrenadante das culturas. A dosagem foi baseada no método de Griess, utilizando curva-padrão com nitrito de sódio (NaNO_3), tendo a concentração de $200\mu\text{M}$ como a mais elevada e 11 pontos de diluição seriada. A curva padrão foi diluída 1:2 em tubos de 1,5mL usando RPMI base como diluente, em duplicata. A solução 1:1 de *N*-(1naphytl)ethylenediamine (NEED) 0,1% em 60% de ácido acético e sulfonamida 1% em 30% de ácido acético foi adicionada ao sobrenadante ou à curva-padrão, homogeneizada e, imediatamente, a densidade óptica foi determinada em comprimento de onda de 560nm em espectrofotômetro. Os valores foram obtidos com o *software* SoftMax Pro. Os resultados foram expressos como a concentração micromolar de nitrito das amostras.

4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa GraphPad Prism versão 5.01.3. O teste paramétrico ANOVA foi utilizado para a análise da distribuição de variáveis quantitativas, com mais de 3 categorias dentro dos grupos dos experimentos. O teste T independente foi utilizado para a análise de duas variáveis numéricas, na comparação de dois grupos de valores dentro de uma mesma variável. Os valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos para os testes aplicados.

4.9 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

O presente trabalho faz parte do projeto intitulado “Moléculas associadas à ativação endotelial, interações célula-célula e células endotélio: contribuições nos eventos vaso-oclusivos da Anemia Falciforme”, aprovado sob o parecer nº 185.244/2012 do comitê de ética do Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz.

5. RESULTADOS

5.1. CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA DAS CÉLULAS HUVEC

Antes de iniciar os experimentos foi realizada a avaliação do fenótipo das células HUVEC por citometria de fluxo (Pitanga e Vilas-Boas, 2011, dados não publicados) em nosso laboratório. As células HUVEC de linhagem imortalizada utilizadas nos experimentos foram gentilmente doadas pela Dra Ana Moretti e pelo Dr. Heraldo Possolo de Souza, da Faculdade de Medicina da USP/SP. A marcação extracelular direta revelou que as células expressam CD54 (ICAM-1), marcador de superfície expresso por este tipo celular (Figura 6).

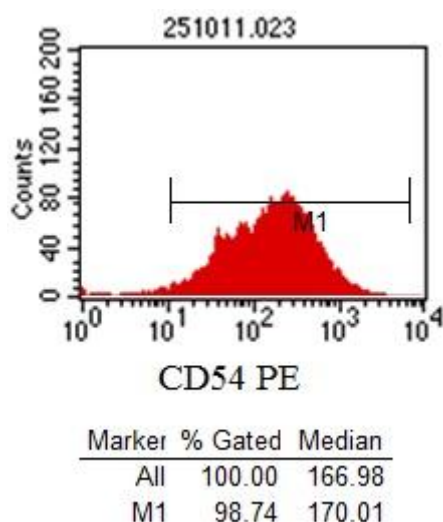


Figura 6. Marcação extracelular direta da molécula de adesão CD54-ficoeritina (PE) em células HUVEC de linhagem imortalizada.

5.2. PRODUÇÃO DE FATOR TECIDUAL

As células endoteliais podem expressar a glicoproteína de membrana FT (fator III da coagulação, CD142 ou tromboplastina) em resposta a estímulos que causem lesão endotelial. O FT é um componente essencial para o início da cascata da coagulação pela via extrínseca, por isso, o perfil pró-coagulatório das culturas foi avaliado.

A avaliação do FT após estímulo das células endoteliais com heme nas concentrações de 50 μ M e 70 μ M mostrou a produção de 25,66 \pm 2,41pg/mL e 28,22 \pm 0,25pg/mL, respectivamente. Foi observada diferença estatística ($p=0,0109$ e $p=0,0001$, respectivamente) em comparação com a ausência de estímulo, sendo que as células expressaram 18,79 \pm 1,07pg/mL (teste t independente). Não foi observada diferença estatística na análise entre as células estimuladas com 30 μ M de heme e o controle negativo (ausência de estímulos), uma vez que a produção de FT foi de 21,6 \pm 2,5pg/mL (Figura 7).

O tratamento das células HUVEC apenas com sinvastatina a 0,1 μ M, na ausência de heme, aumentou discretamente a produção de FT (23,88 \pm 2,02pg/mL), que foi estatisticamente significativa quando comparado à ausência da droga ($p=0,0183$). A adição de HU às culturas demonstrou aumento na produção de FT nas três concentrações utilizadas (50, 100 e 200 μ M), com produção de 25,52 \pm 0,23pg/mL, 24,62 \pm 0,91pg/mL e 21,58 \pm 0,22, respectivamente, ao compararmos com a ausência de estímulos ($p=0,0005$, $p=0,002$, $p=0,00117$, respectivamente). Desta forma, podemos observar que a produção de FT decresce a medida que a concentração de HU aumenta (Figura 7).

O tratamento com o ácido ascórbico aumentou a produção de FT pelas células HUVEC nas três concentrações utilizadas, sendo que houve produção de 22,97 \pm 0,53pg/mL ($p=0,0038$) na concentração de 30 μ M; produção de 26,24 \pm 1,59pg/mL ($p=0,0025$) na concentração de 60 μ M, e de 23,82 \pm 0,29pg/mL ($p=0,0015$) na concentração de 120 μ M. Os valores de p

referem-se a comparação de cada concentração com a ausência de tratamentos (Figura 7).

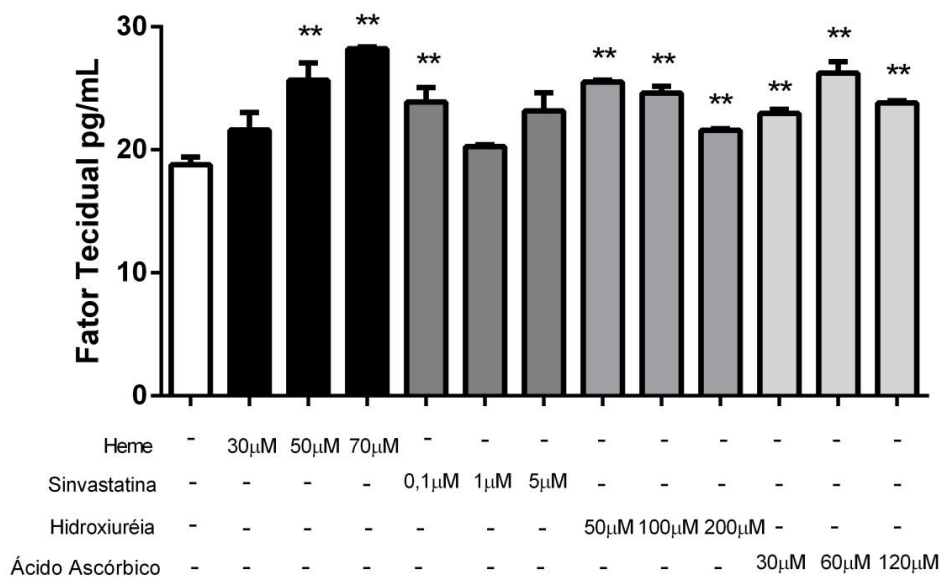


Figura 7. Avaliação da produção de fator tecidual pelas células HUVEC após estímulo com concentrações diferentes de heme, sinvastatina, hidroxiuréia e ácido ascórbico em comparação ao controle negativo, n=3, média das triplicatas, **p<0.01 (teste t independente).

i. Efeito da hidroxiuréia na produção de fator tecidual pelas células HUVEC estimuladas pelo heme

O estímulo das células HUVEC com 30µM de heme teve efeito na produção de FT; no entanto, todos os tratamentos em associação com a menor concentração de heme alteraram a produção da glicoproteína (Figura 8a). A produção de FT foi de $26,29 \pm 0,14$ pg/mL ($p=0,0317$) quando utilizamos a HU na concentração de 100µM (Figura 8a).

A produção do FT pelas células HUVEC foi maior ($25,66 \pm 2,41$ pg/mL) após estímulo com 50µM de heme quando comparada a produção por células não estimuladas ($p=0,0109$). A produção de FT foi modulada pelos tratamentos com concentrações diferentes de HU, sendo que o tratamento concomitante com 50µM de HU teve expressão de $18,61 \pm 0,07$ pg/mL de FT ($p=0,0072$) (Figura 8b). As células HUVEC após estímulo com 70µM de heme produziram

28,22 ± 0,257pg/mL de FT quando comparada a produção por células não estimuladas ($p=0,0001$) (8c). A produção de FT diminuiu nos ensaios com a HU na concentração de 50 μ M, com produção de 22,83 ± 0,07pg/mL ($p=0,0001$); na concentração de 100 μ M, com produção de 17,18 ± 4,86pg/mL ($p<0,0004$), e de 23,11 ± 3,24pg/mL na presença de 200 μ M de HU, sendo que esta última diferença não foi significativa (Figura 8c).

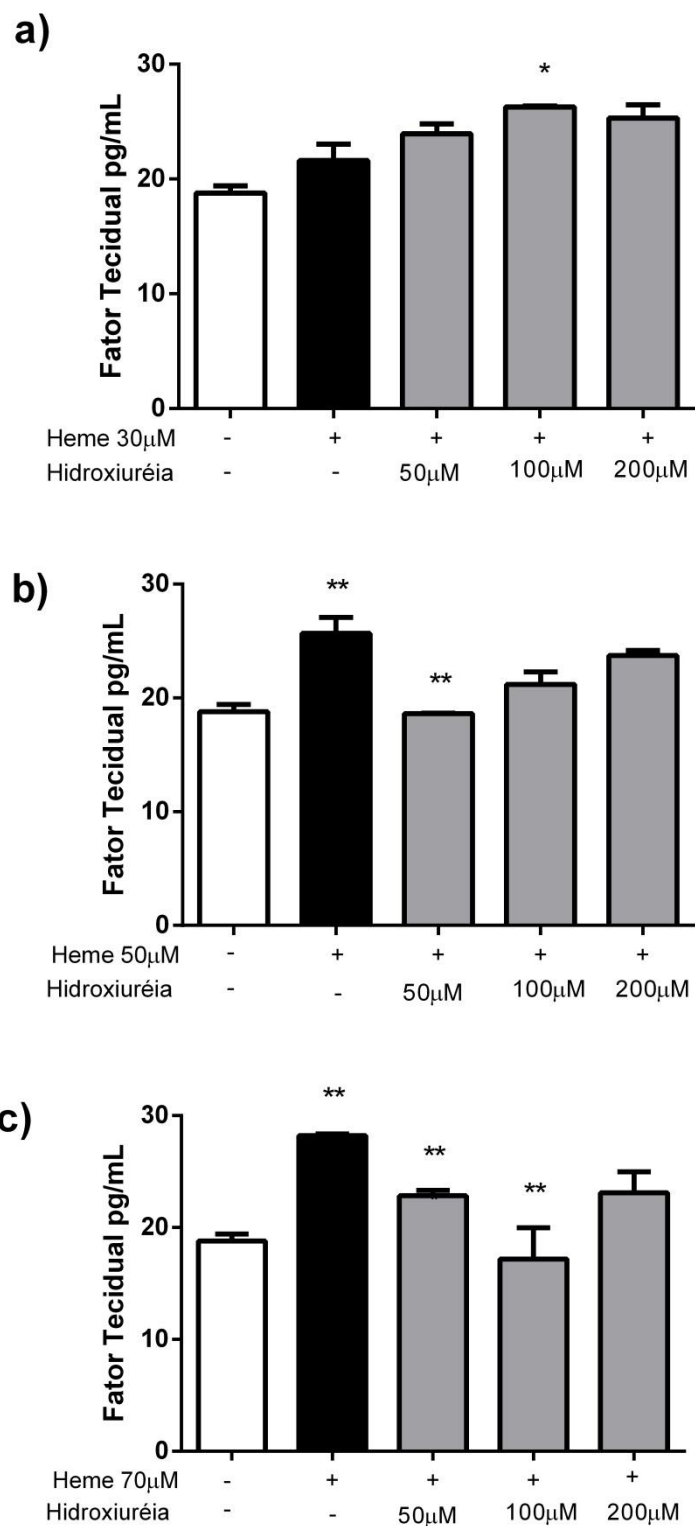


Figura 8. Efeito da hidroxiuréia e do estímulo com concentrações crescentes de heme (30µM, 50µM, 70µM) na produção de fator tecidual pelas células HUVEC em comparação com a ausência de tratamento, n=3, média das triplicatas, *p<0,05 e **p<0.01 (teste t independente).

5.2.2 Efeito da sinvastatina na produção de fator tecidual pelas células HUVEC estimuladas pelo heme

Nós encontramos aumento discreto na produção de FT quando as células endoteliais foram estimuladas pela menor concentração de heme e tratamentos com 1 μ M de sinvastatina (26,12 \pm 0,23pg/mL) e 5 μ M de sinvastatina 26,17 \pm 0,05pg/mL ($p=0,0373$ e $p=0,0341$, respectivamente) (Figura 9a). A sinvastatina não exerceu efeito na produção de FT pelas células HUVEC estimuladas por 50 μ M de heme (Figura 9b). Na presença de 70 μ M de heme e 0,1 μ M de sinvastatina como tratamento, a produção de FT foi de 30,35 \pm 0,23pg/mL ($p=0,0005$); com 1 μ M de sinvastatina foi de 24,36 \pm 2,21pg/mL ($p=0,0400$), e com 5 μ M de sinvastatina foi de 22,68 \pm 0,20pg/mL ($p<0,0001$) (teste t independente; Figura 9c).

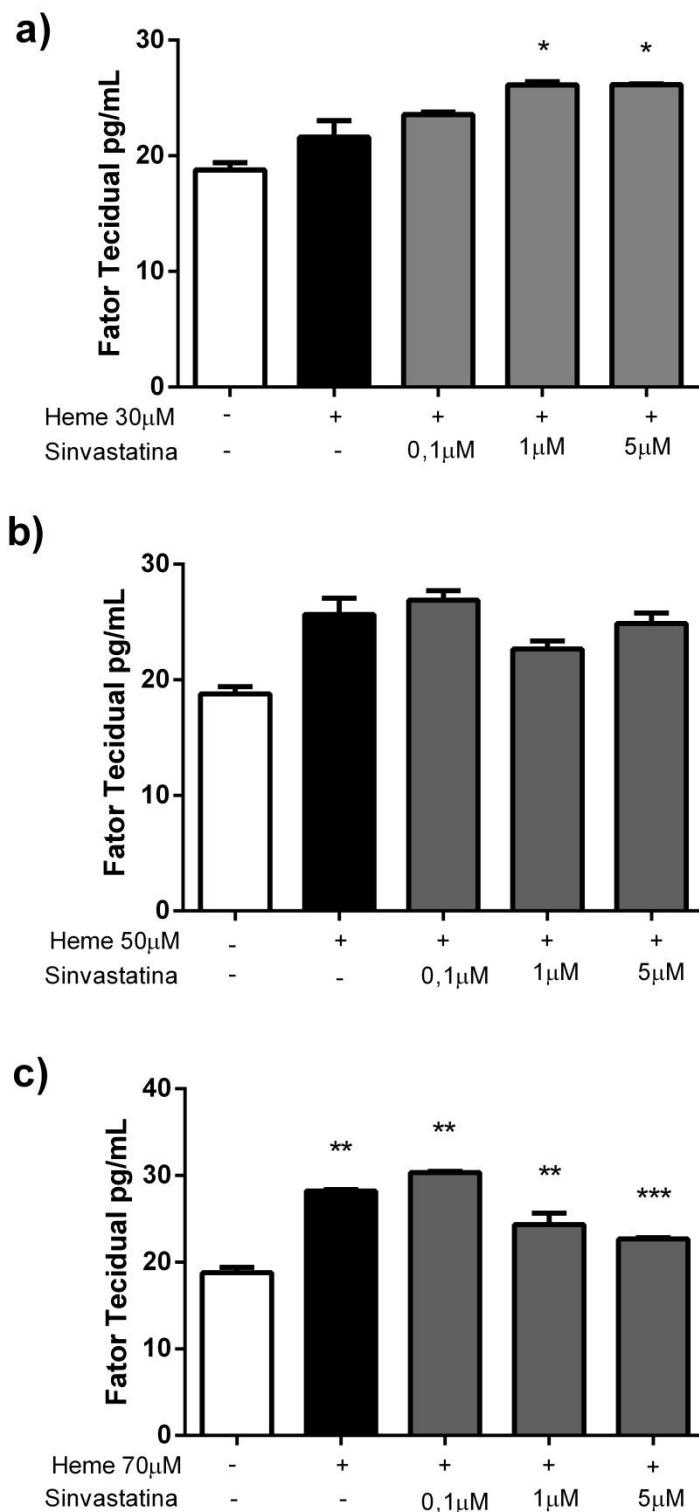


Figura 9. Avaliação da produção de fator tecidual pelas células HUVEC após estímulo com concentrações crescentes de heme (30µM, 50µM e 70µM) e tratamento com sinvastatina em comparação a ausência de tratamentos, n=3, média das triplicatas, *p<0,05; **p<0,01 e ***p<0,001 (teste t independente).

5.2.3 Efeito do ácido ascórbico na produção de fator tecidual pelas células HUVEC estimuladas com heme

A produção de FT foi de $13,68 \pm 4,24$ pg/mL ($p=0,0497$) quando as células HUVEC foram estimuladas com $30\mu\text{M}$ de heme e tratadas com $120\mu\text{M}$ de ácido ascórbico (Figura 10a). A produção de FT pelas células HUVEC foi de $21,16 \pm 0,73$ pg/m ($p=0,0368$) após estímulo com $50\mu\text{M}$ de heme e tratamento com $30\mu\text{M}$ de ácido ascórbico (Figura 10b). Quando as células endoteliais forma estimuladas com a concentração mais elevada de heme ($70\mu\text{M}$) e tratadas com ácido ascórbico observamos a produção de $15,51 \pm 3,26$ pg/mL após o tratamento das células com $30\mu\text{M}$ de ácido ascórbico; de $21,88 \pm 2,23$ pg/mL após tratamento com $60\mu\text{M}$ e de $24,04 \pm 1,47$ pg/mL após tratamento com $120\mu\text{M}$, demonstrando a influência deste antioxidante na produção de FT em todas as concentrações utilizadas ($p=0,0026$, $p=0,0082$, $p=0,0086$, teste t independente) (Figura 10c). Ressaltamos que a maior redução na produção de FT foi alcançada após a utilização da menor concentração de ácido ascórbico ($30\mu\text{M}$), demonstrando que a ação não é proporcional ao aumento da dose.

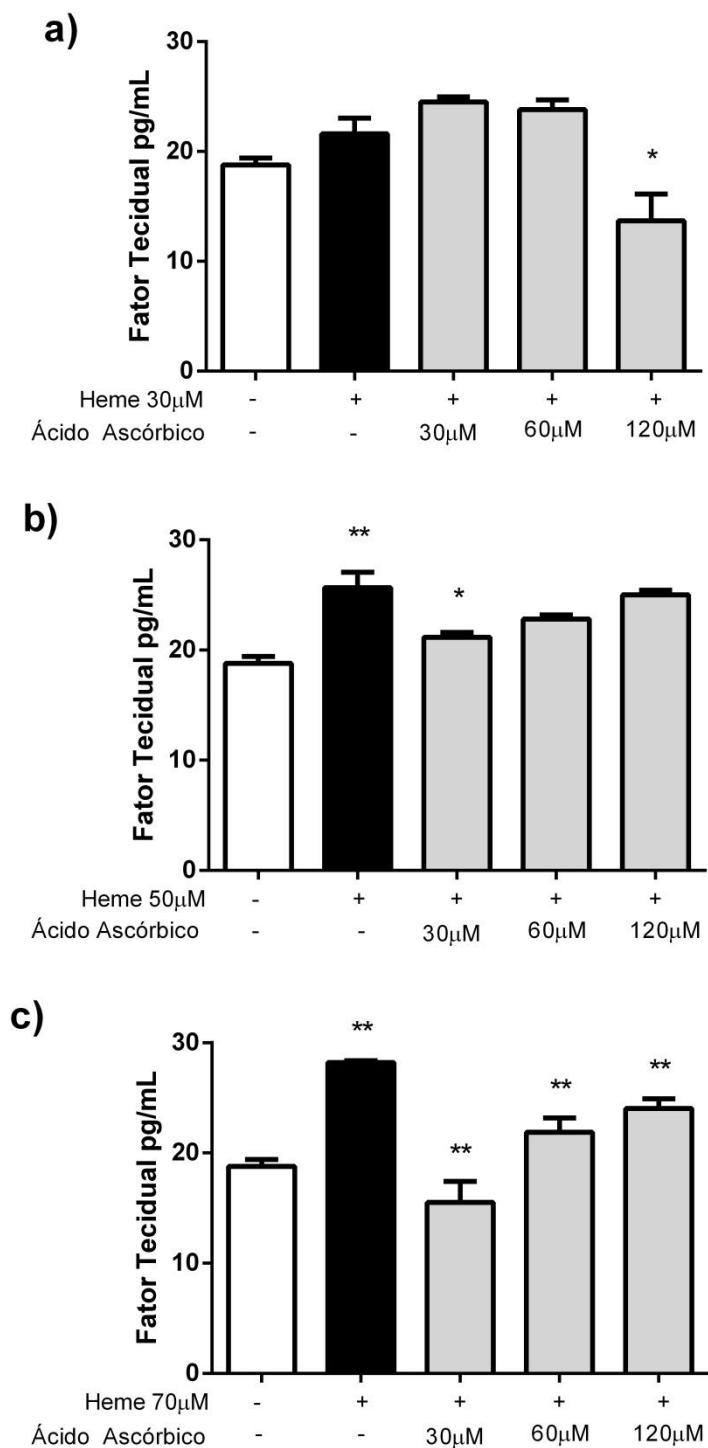


Figura 10. Avaliação do efeito do ácido ascórbico na produção de fator tecidual pelas células HUVEC estimuladas por concentrações crescentes de heme (30μM, 50μM e 70μM) em comparação com a ausência de tratamentos, n=3, média das triplicatas, *p<0,05; **p<0.01 (teste t independente).

5.2.4 Efeito da combinação dos tratamentos na produção de fator tecidual por células HUVEC estimuladas com heme

A produção de FT pelas células HUVEC foi avaliada em relação ao tratamento combinado entre as drogas e ao estímulo com 70 μ M de heme. Desta forma, houve diminuição na produção de FT pelas células HUVEC quando as células foram tratadas simultaneamente com sinvastatina e HU ($p=0,0005$), e com HU e ácido ascórbico ($p=0,0361$), quando comparadas com a ausência de tratamentos. Não foi observada diferença significativa quando os tratamentos isolados foram comparados com os tratamentos combinados (Figura 11).

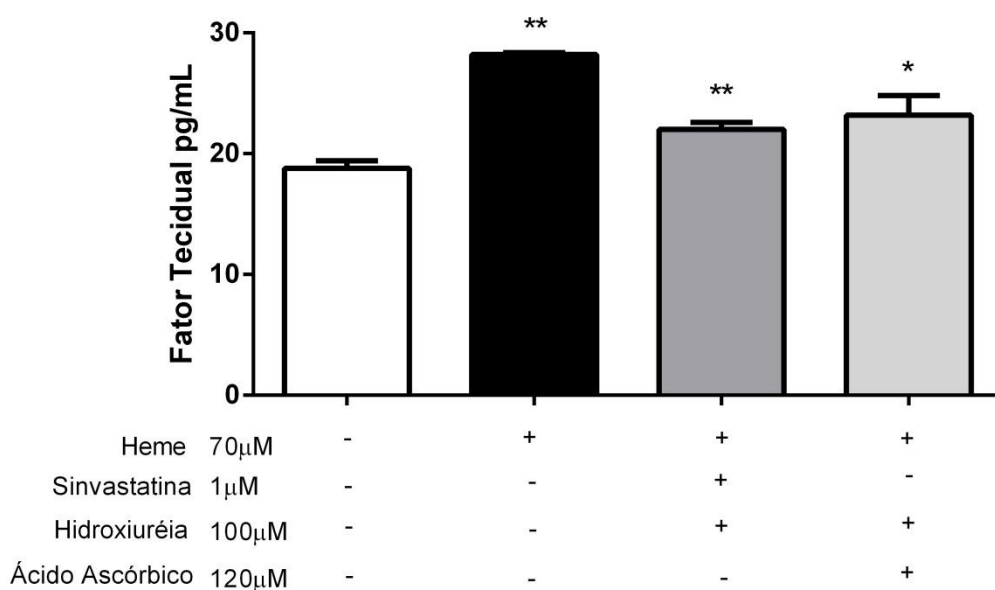


Figura 11. Avaliação do efeito de tratamentos combinados na produção de fator tecidual pelas células HUVEC sob estímulo de 70 μ M de heme, em comparação com a ausência de tratamentos, $n=3$, média das triplicatas, * $p<0,05$ e ** $p<0,011$ (teste t independente).

5.3. DOSAGEM INDIRETA DE ÓXIDO NÍTRICO

Os ensaios de ativação celular foram realizados com concentrações crescentes de heme, e os seguintes tratamentos: sinvastatina, HU e ácido ascórbico. As células endoteliais produzem o NO por mecanismos enzimáticos e, no microambiente vascular, o gás tem papel vasodilatador importante (STEINBERG, 2008). A propriedade vasodilatadora do NO constitui um alvo terapêutico já estudado na vasculopatia da AF.

A produção de NO foi avaliada indiretamente no sobrenadante da cultura de células HUVEC pelo método de Griess sob os estímulos e tratamentos. Nós detectamos a presença de nitrito em todos os sobrenadantes das culturas estimuladas com 30, 50 ou 70 μ M de heme, com produção de $34,45 \pm 2,67$; $37,76 \pm 0,18$; $41,56 \pm 1,99\mu$ M de nitrito, respectivamente. Os resultados demonstraram efeito de dose com o aumento das concentrações de heme, que foram significantes quando comparados a ausência de heme ($25,11 \pm 0,048\mu$ M de nitrito) ($p=0,0038$; $p<0,0001$; $p=0,0001$, teste t independente, respectivamente) (Figura 12).

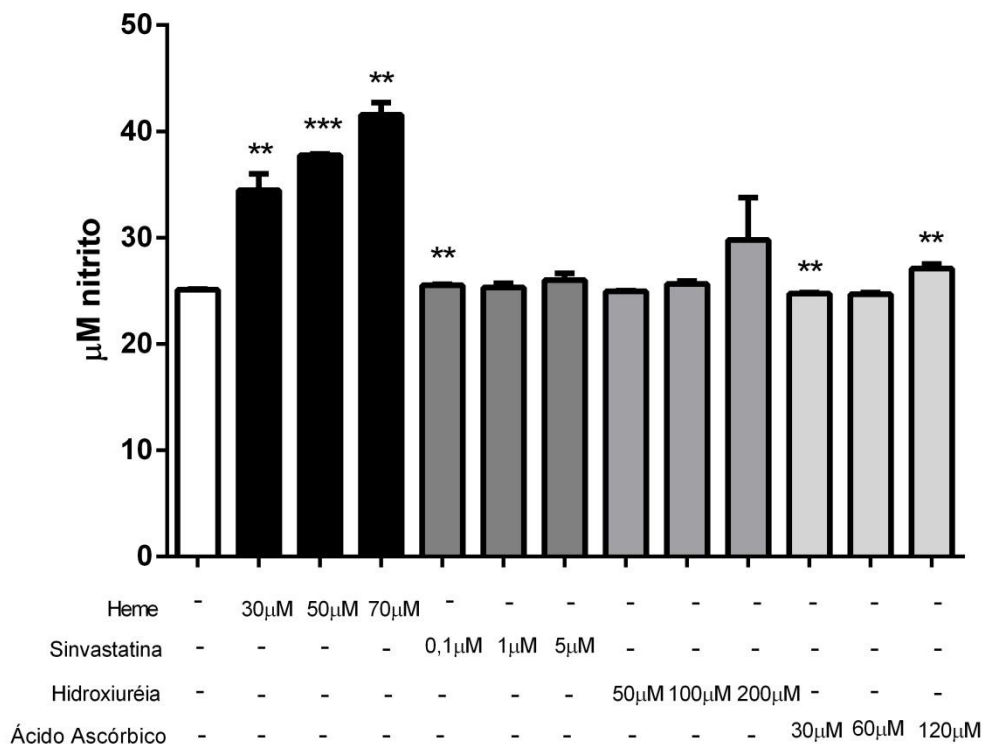


Figura 12. Efeito dos tratamentos e do heme nas várias concentrações utilizadas nos ensaios para produção de nitrito pelas células HUVEC, em comparação ao controle negativo, n=3, média das triplicatas, *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001 (teste t independente).

Quando as células HUVEC foram tratadas apenas com simvastatina detectamos aumento discreto na produção de nitrito na presença de simvastatina na concentração de 0,1 μM em comparação ao controle negativo ($25,54 \pm 0,12 \mu\text{M}$; $p=0,0077$) quando. A HU não modificou de forma significativa a produção de nitrito pelas células HUVEC. Já o tratamento com o ácido ascórbico na concentração de 30 μM reduziu discretamente a produção de nitrito ($24,75 \pm 0,12 \mu\text{M}$; $p=0,0161$). Entretanto, o tratamento das células HUVEC com ácido ascórbico na concentração de 120 μM, aumentou discretamente a produção de nitrito ($27,08 \pm 0,77 \mu\text{M}$; $p=0,0116$) (Figura 12).

5.3.1 Efeito da hidroxiuréia na produção de nitrito pelas células HUVEC estimuladas com heme

Para conhecer o efeito dos tratamentos, todas as concentrações foram combinadas nos ensaios. Quando a concentração de heme foi 30 μ M, as células produziram $34,45 \pm 2,67\mu$ M de nitrito ($p=0,0038$). Os tratamentos combinados com HU não tiveram efeito na produção de nitrito (Figura 13a).

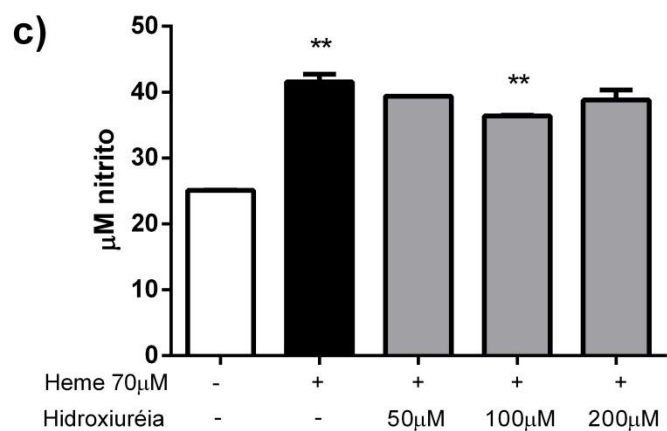
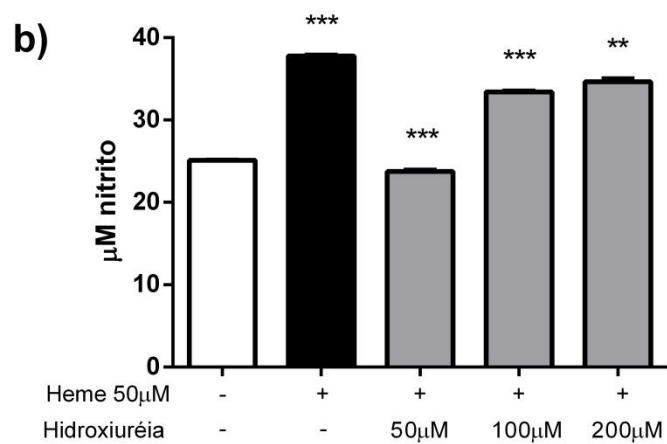
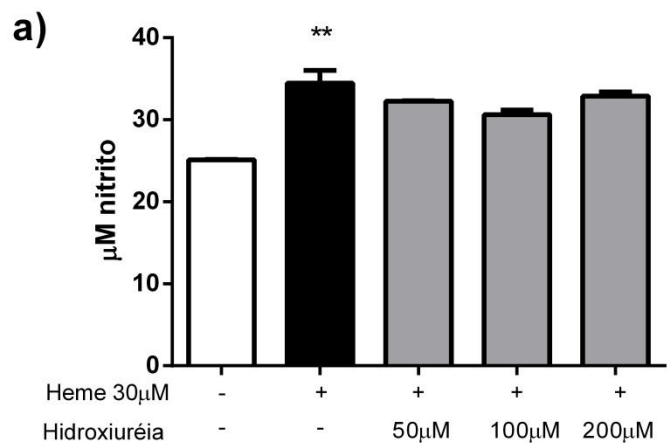


Figura 13. Efeito da hidroxiuréia e do estímulo com heme em concentrações crescentes de (30 μ M, 50 μ M e 70 μ M) na produção de nitrito pelas células HUVEC, em comparação com a ausência de tratamentos, n=3, média das triplicatas, *p<0,05; **p<0.01 e ***p<0,001 (teste t independente).

Após o estímulo das células HUVEC com 50 μ M de heme a produção de nitrito foi maior (37,76 \pm 0,18 μ M) quando comparada ao controle negativo (p<0,0001). A produção de nitrito nas células HUVEC estimuladas com 50 μ M de heme e tratadas com HU nas concentrações de 50, 100 e 200 μ M foi de 23,76 \pm 0,28 μ M (p<0,0001), 33,40 \pm 0,16 μ M (p<0,0001), e 34,65 \pm 0,63 μ M (p=0,0012) , respectivamente (teste t independente) (Figura 13b). Quando o heme foi utilizado na concentração de 70 μ M, as células endoteliais produziram 41,56 \pm 1,99 μ M de nitrito (p=0,0001). Nós encontramos diferenças estatisticamente significativas na produção de nitrito quando as células endoteliais foram tratadas com 100 μ M de HU (36,38 \pm 0,25 μ M; p=0,0110) (Figura 13c).

5.3.2 Efeito da sinvastatina na produção de nitrito pelas células HUVEC estimuladas com heme

A produção de nitrito pelas células endoteliais estimuladas por 30 μ M de heme e tratadas com sinvastatina não foi alterada (Figura 14a). Foi observada diferença significativa na produção de nitrito quando avaliado em células endoteliais estimuladas por 50 μ M de heme e tratadas com 0,1 μ M de sinvastatina (35,72 \pm 0,40 μ M; p=0,0013) e 1 μ M de sinvastatina (32,98 \pm 2,58 μ M; p=0,0328), respectivamente (Figura 14b). A concentração mais elevada de sinvastatina utilizada não exerceu efeito na produção de nitrito. O tratamento das células endoteliais com sinvastatina não exibiu efeito quando as células foram estimuladas na concentração mais elevada de heme (Figura 14c).

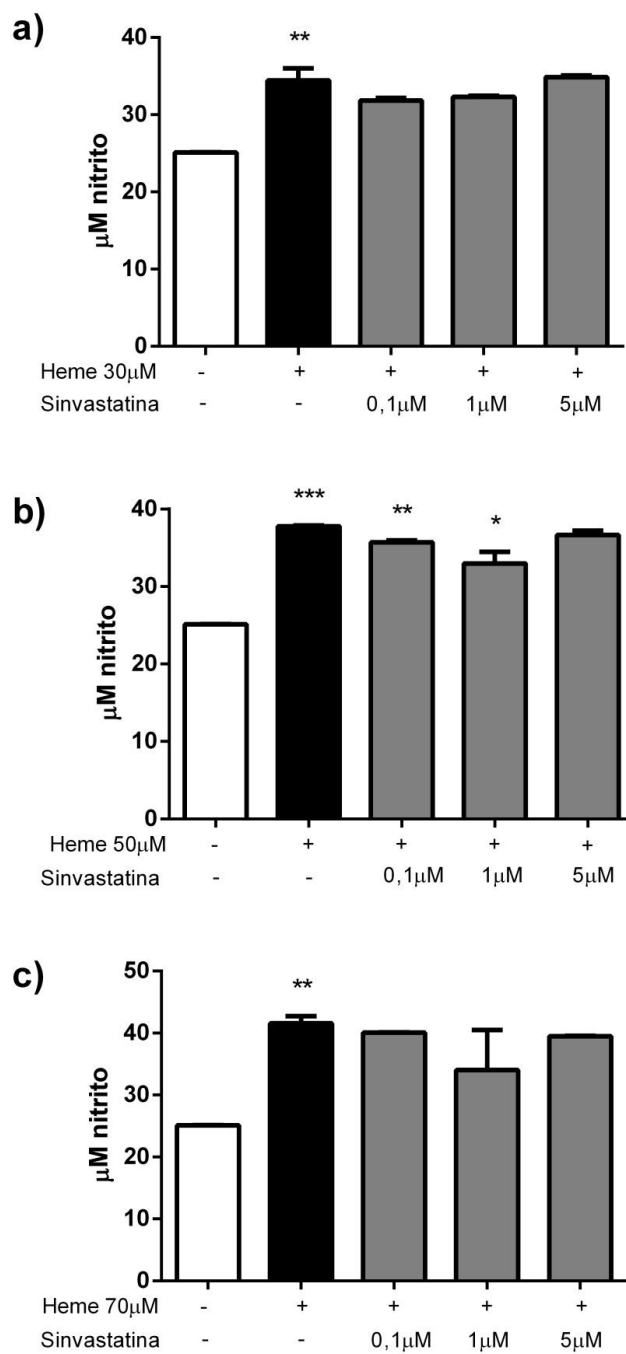


Figura 14. Efeito da simvastatina e do estímulo com concentrações crescentes de heme (30μM, 50μM, 70μM) na produção de nitrito pelas células HUVEC, em comparação a ausência de tratamento, n=3, média das triplicatas, *p<0,05; **p<0.01; ***p<0,001 (teste t independente).

5.3.3 Efeito do ácido ascórbico na produção de nitrito pelas células HUVEC estimuladas com heme

As células endoteliais diminuíram a produção de nitrito na presença de 30 μ M de heme e 60 μ M de ácido ascórbico ($29,39 \pm 0,67\mu\text{M}$; $p=0,0337$) e 120 μ M de ácido ascórbico ($28,73 \pm 0,09\mu\text{M}$; $p=0,0209$) (Figura 15a). A produção de nitrito pelas células endoteliais aumentou significativamente na presença de 50 μ M de heme e de concentrações de 30, 60 e 120 μ M de ácido ascórbico ($33,45 \pm 0,15\mu\text{M}$; $p<0,0001$; $34,06 \pm 0,57\mu\text{M}$, $p=0,0004$ e $33,25 \pm 0,35\mu\text{M}$, $p<0,0001$, respectivamente); (Figura 15b). Quando as células HUVEC foram estimuladas com 70 μ M de heme e tratadas com as concentrações de 30, 60 e 120 μ M de ácido, a produção de nitrito foi observada nas concentrações de $37,11 \pm 0,05\mu\text{M}$, $p=0,0179$; $36,89 \pm 1,13\mu\text{M}$, $p=0,0242$; $37,81 \pm 0,67\mu\text{M}$, $p=0,0359$, respectivamente (teste t independente) (Figura 15c).

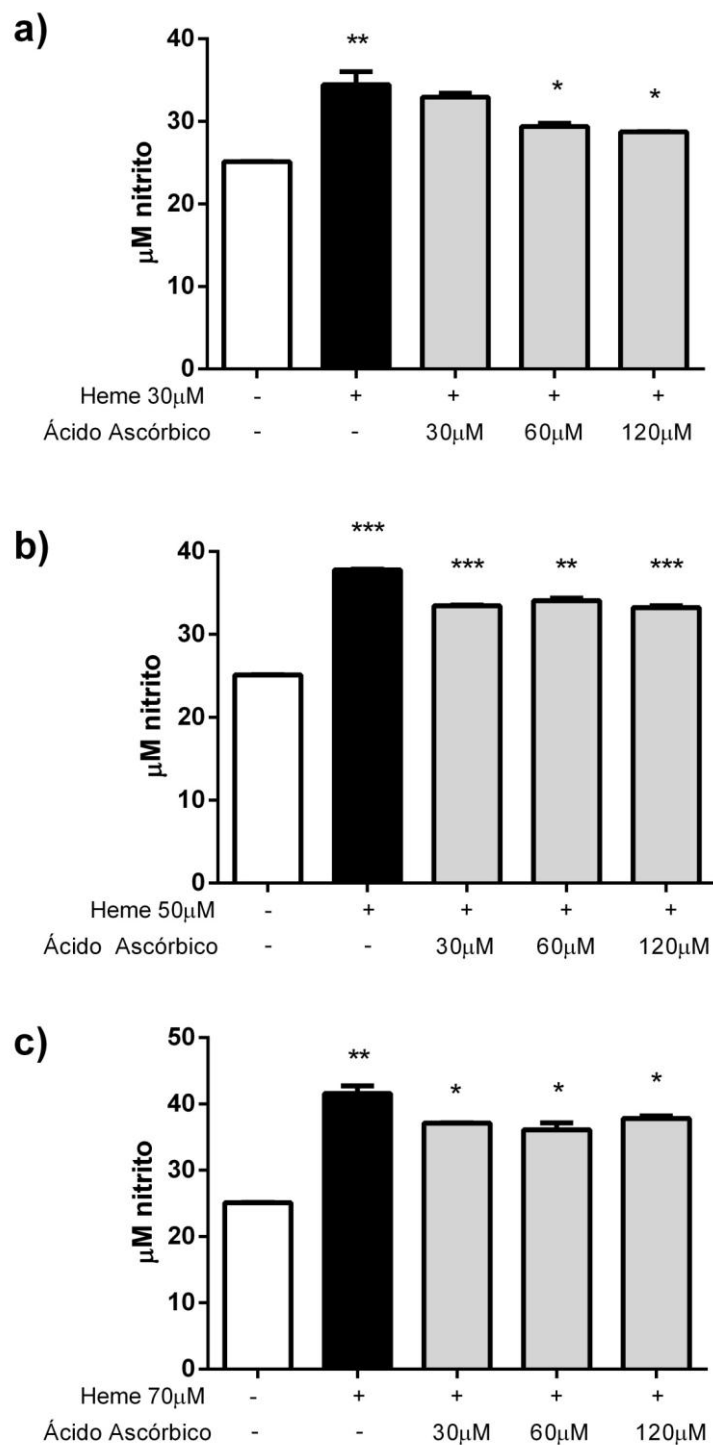


Figura 15. Efeito do ácido ascórbico e do estímulo com concentrações crescentes de heme (30µM, 50µM, 70µM) na produção de nitrito pelas células HUVEC, em comparação a ausência de tratamentos, n=3, média das triplicatas, *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001 (teste t independente).

5.3.4 Efeito da combinação dos tratamentos na produção de nitrito pelas células HUVEC estimuladas com heme

A produção de nitrito aumentou discretamente nas células endoteliais estimuladas por 70 μ M de heme, e tratadas com HU e na sua combinação com sinvastatina ($p=0,0101$) HUVEC (Figura 16).

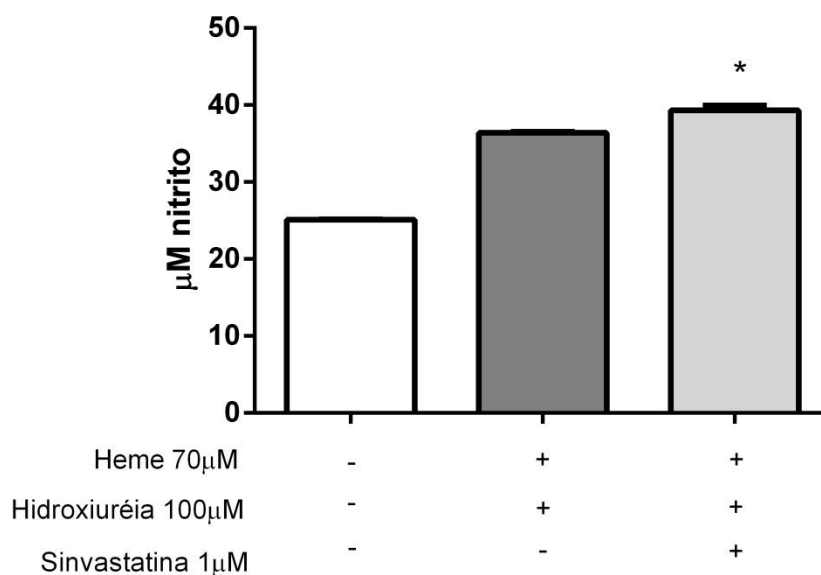


Figura 16. Efeito da combina o dos tratamentos e do est mulo com heme na produ o de nitrito pelas c lulas HUVEC, em compara o ao tratamento apenas com hidrox iur ia, $n=3$, m dia das triplicatas, * $p<0,05$ (teste t independente).

5.4. PRODU O DE ENOS

As NOS s o enzimas respons veis pela produ o de NO, g s com propriedade vasodilatadora. Nas c lulas endoteliais, a isoforma eNOS produz o NO a partir do amino cido L-arginina. Nos ensaios de ativa o celular, a partir dos resultados da dosagem indireta de NO, as condi es experimentais foram

repetidas para avaliação da produção da enzima que foi quantificada a partir do lisado celular.

Todas as concentrações de heme utilizadas aumentaram a produção de eNOS de maneira significativa, quando comparados ao controle negativo. Usando 30 μ M de heme, a produção de eNOS foi de 355,07 \pm 26,01pg/mL ($p=0,0008$), com 50 μ M a produção foi de 518,31 \pm 126,04pg/mL ($p=0,0050$) e com 70 μ M foi 251,07 \pm 54,23pg/mL ($p=0,0153$) (Figura 17).

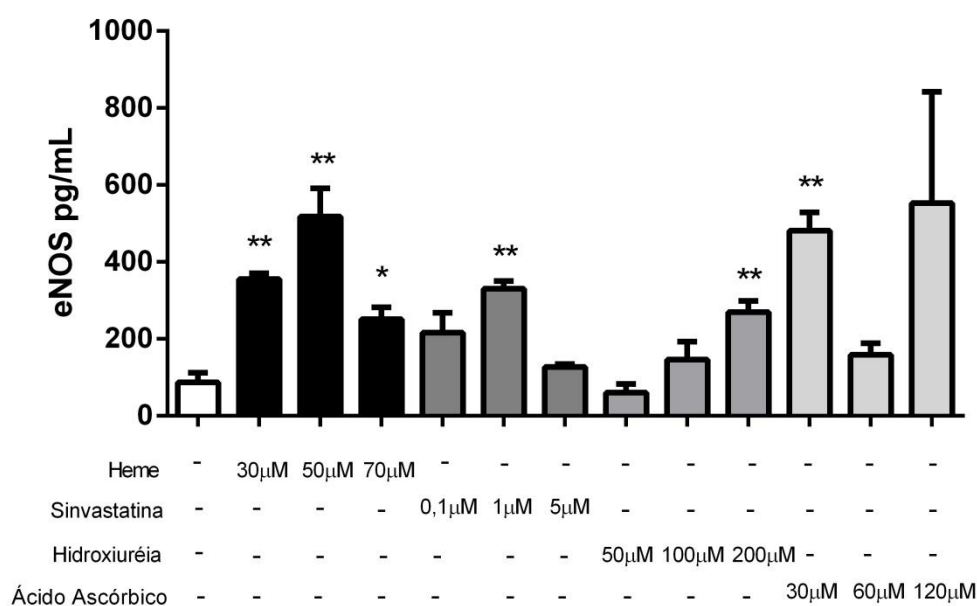


Figura 17. Efeito dos tratamentos e do heme na produção de eNOS pelas células HUVEC, em comparação ao controle negativo, $n=3$, média das triplicatas, $*p<0,05$ e $**p<0,01$ (teste t independente).

O estímulo com simvastatina elevou a produção de eNOS, sendo que o uso na concentração de 1 μ M aumentou a produção de maneira significativa (330,52 \pm 34,29pg/mL, $p=0,0017$). A HU aumentou a produção de eNOS de maneira dose-dependente, sendo que a maior concentração utilizada (200 μ M) produziu aumento significativo (269,88 \pm 49,49pg/mL, $p=0,0088$). O ácido ascórbico também elevou a eNOS, todavia, ao contrário da HU, o efeito foi

estatisticamente significativa quando a menor concentração foi adicionada (30 μ M), $480,89 \pm 82,93$ pg/mL ($p=0,0019$) (Figura 17).

5.4.1 Efeito da hidroxiuréia na produção de eNOS pelas células HUVEC estimuladas com heme

As células estimuladas com 50 μ M de heme produziram $518,31 \pm 126,04$ pg/mL de eNOS ($p=0,0050$). Todos os tratamentos avaliados modularam a produção de eNOS nas culturas (Figura 18). Quando as células foram tratadas com HU em associação com o estímulo de 50 μ M de heme houve redução da produção da eNOS nas concentrações mais baixas, seguido por aumento sem diferença estatística com 200 μ M da droga. Usando 50 μ M de HU, as células produziram $8,14 \pm 4,51$ pg/mL ($p=0,0022$) e usando 100 μ M produziram $115,64 \pm 22,59$ pg/mL ($p=0,0055$) (Figura 18a). A maior concentração de HU aumentou a produção de eNOS pela cultura, contudo o aumento não teve significância estatística. A HU reduziu a produção de eNOS das células HUVEC estimuladas com 70 μ M de heme e tratadas com 50 μ M de HU, o que levou à produção de $33,06 \pm 6,96$ pg/mL ($p=0,0023$), com 100 μ M foi de $96,14 \pm 17,67$ pg/mL ($p=0,0093$) (Figura 18b).

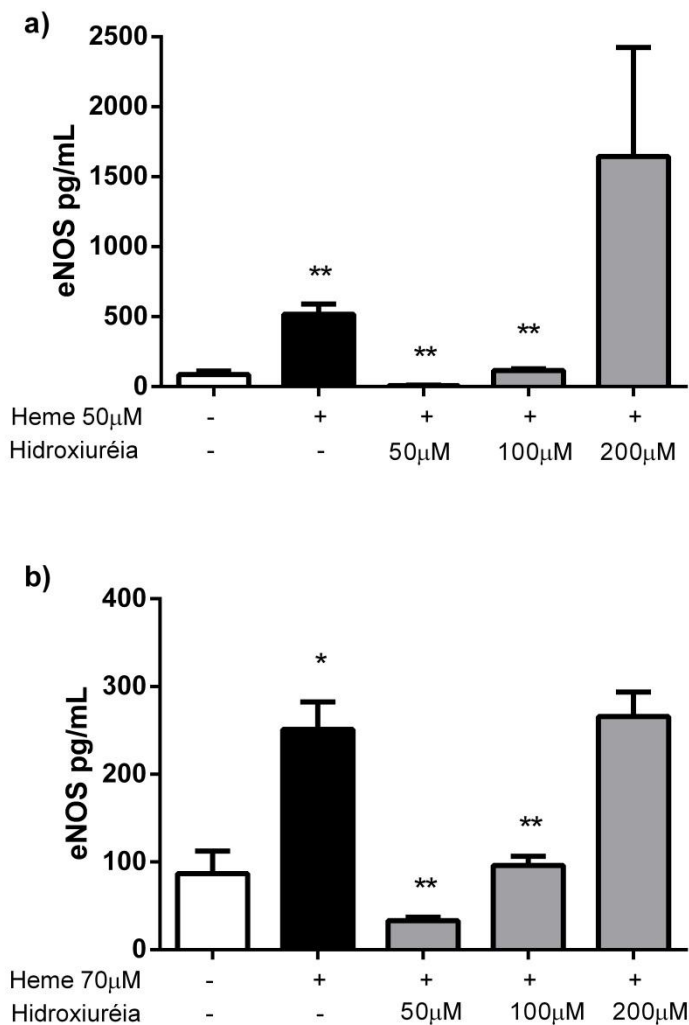


Figura 18. Efeito da hidroxiur ea e do est mulo com concentra es crescentes de heme (50 μ M, 70 μ M) na produ o de eNOS pelas c lulas HUVEC, em compara o com a aus ncia de tratamento, n=3, m dia das triplicatas, *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001 (teste t independente).

5.4.2 Efeito da sinvastatina na produ o de eNOS pelas c lulas HUVEC estimuladas com heme

O tratamento concomitante das c lulas HUVEC com sinvastatina mostrou efeito significativo na redu o da eNOS nas menores concentra es utilizadas (0,1 μ M e 1 μ M). Na presen a de 0,1 μ M de sinvastatina, a produ o de eNOS foi de $21,89 \pm 1,84$ pg/mL (p=0,0024) e com 1 μ M foi de $140,31 \pm 26,50$ pg/mL (p=0,0071) (Figura 19a) quando as c lulas foram estimuladas com

50 μ M de heme. O tratamento com 5 μ M de sinvastatina não mostrou efeito na produção de eNOS. Quando as células foram estimuladas com 70 μ M de heme, o tratamentos com as menores concentrações de sinvastatina foi capaz de modular a produção de eNOS. Nos ensaios em que as células foram tratadas com sinvastatina, a concentração de 0,1 μ M da droga causou redução significativa na produção de eNOS (34,86 \pm 23,50pg/mL, p=0,0032). As concentrações mais elevadas da droga não tiveram resultado estatisticamente significante, porém aumentaram a produção pelas células (Figura 19b).

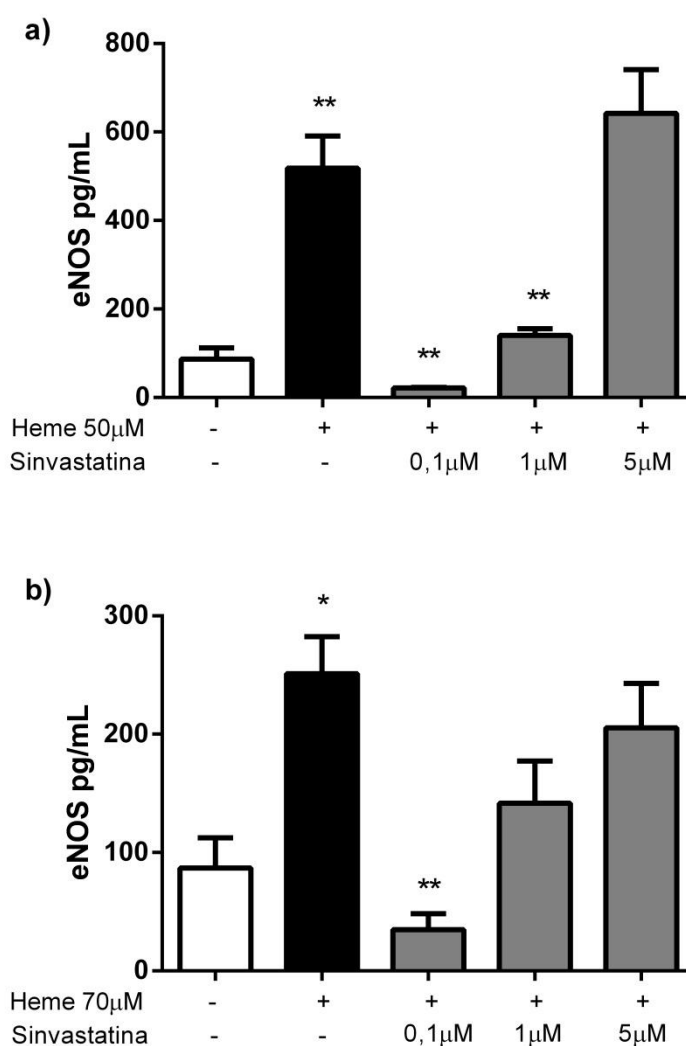


Figura 19. Efeito da sinvastatina e do estímulo com concentrações crescentes de heme (50 μ M, 70 μ M) na produção de eNOS pelas células HUVEC, em comparação com a ausência de tratamento, n=3, média das triplicatas, *p<0,05 e **p<0.01 (teste t independente).

5.4.3 Efeito do ácido ascórbico na produção de eNOS pelas células HUVEC estimuladas com heme

Embora tenha sido verificado na dosagem de NO que apenas o ácido ascórbico tenha modulado a produção de nitrito pelas células quando estimuladas com 30 μ M de heme, esse tratamento não exerceu efeito na produção da enzima eNOS nas mesmas condições experimentais (Figura 20a). As células estimuladas com 50 μ M de heme produziram 518,31 \pm 126,04pg/mL de eNOS ($p=0,0050$). O tratamento com ácido ascórbico também reduziu a produção de eNOS pelas células HUVEC estimuladas com 50 μ M de heme de maneira independente da concentração utilizada. Com 30 μ M, a produção foi de 68,98 \pm 46,89pg/mL ($p=0,0044$), com 60 μ M foi 241,59 \pm 112,69pg/mL ($p=0,0471$), e com 120 μ M foi de 98,51 \pm 32,68pg/mL ($p=0,0050$) (Figura 20b). Quando as células foram estimuladas com 70 μ M de heme o ácido ascórbico não exerceu efeito estatisticamente significativo, embora tenha aumentado numericamente a quantidade de eNOS (Figura 20c).

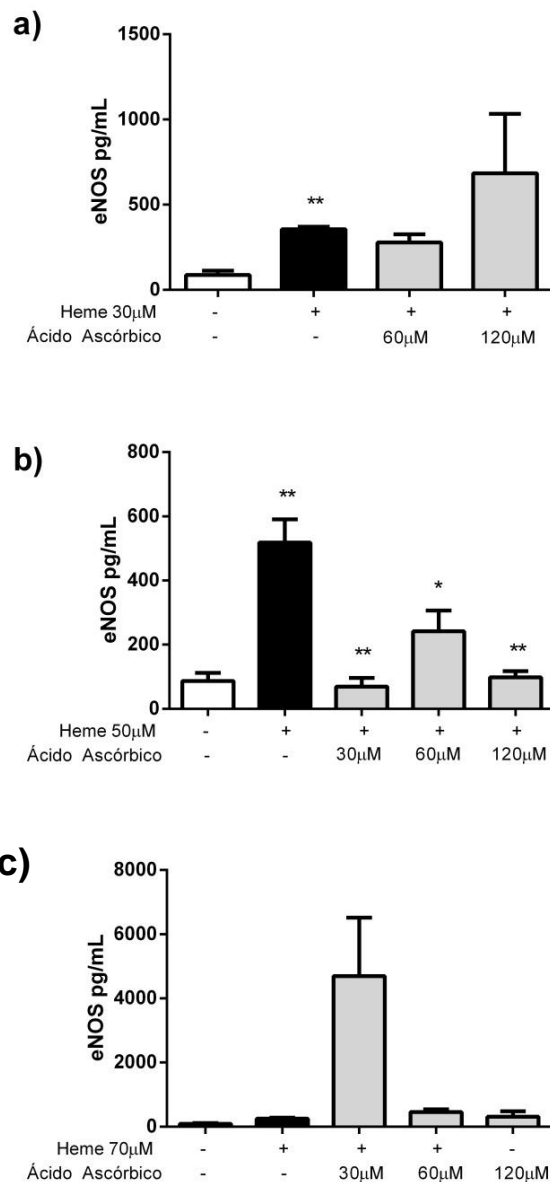


Figura 20. Efeito do ácido ascórbico e do estímulo com concentrações crescentes de heme (30µM, 50µM e 70µM) na produção de eNOS pelas células HUVEC, em comparação com a ausência de tratamento, n=3, média das triplicatas, *p<0,05; **p<0.01; ***p<0,001 (teste t independente).

5.5. PRODUÇÃO DE HIF-A

O HIF- α é um fator transcricional das células endoteliais que regula genes envolvidos na angiogênese e na proliferação, com expressão aumentada em situações de hipóxia.

A produção de HIF- α pelas células foi medida pela fluorescência do ELISA. Nas culturas em que havia apenas células e meio de cultura sem estímulo, a fluorescência do HIF- α foi 1082 ± 170 RFU. O estímulo com $30\mu\text{M}$, $50\mu\text{M}$ e $70\mu\text{M}$ de heme exibiu 3956 ± 1868 RFU, $2775,5 \pm 192,5$ RFU e 4351 ± 1109 RFU, respectivamente. Entre as concentrações utilizadas apenas com $50\mu\text{M}$ e $70\mu\text{M}$ de heme houve diferença estatística significativa em relação ao que as células produzem na ausência de estímulo ($p=0,0003$ e $p=0,0072$, teste t independente) (Figura 21). Não houve diferença estatística significativa quando a menor concentração de heme foi utilizada.

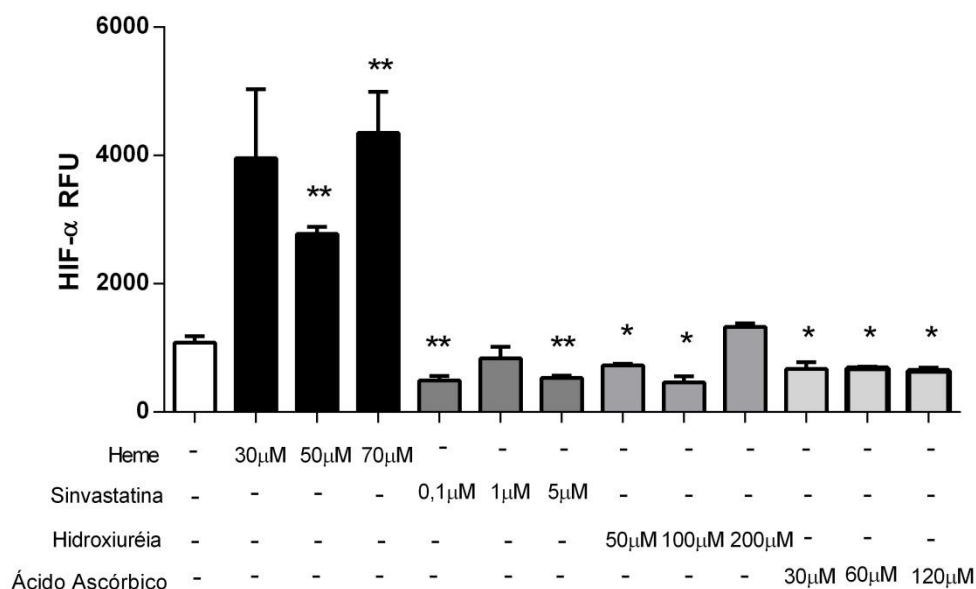


Figura 21. Efeito dos tratamentos e do heme nas várias concentrações utilizadas nos ensaios para produção de HIF- α células HUVEC, em comparação ao controle negativo, $n=3$, média das triplicatas, * $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$ (teste t independente).

Os tratamentos aplicados nas células na ausência de heme modificaram a produção do fator transcricional. Todos os tratamentos diminuíram a produção do HIF- α quando comparados à ausência de estímulos.

A simvastatina reduziu de maneira estatisticamente significativa a produção de HIF- α quando utilizada na concentração de $0,1\mu\text{M}$ (490 ± 129 RFU, $p=0,0086$) e $5\mu\text{M}$ (531 ± 62 RFU, $p=0,0062$). O tratamento com $1\mu\text{M}$ de simvastatina não provocou modificação estatisticamente significativa. A HU com

50 μ M foi reduziu o HIF- α para $727,5 \pm 45,5$ RFU ($p=0,0251$), utilizando 100 μ M da droga a redução foi para $463,5 \pm 166,5$ RFU ($p=0,0168$). O ácido ascórbico também diminuiu a produção em todas as concentrações aplicadas nas células. Utilizando 30 μ M foi observado 672 ± 179 RFU ($p=0,0452$), com 60 μ M foi observado $681,5 \pm 18,5$ RFU ($p=0,0154$), e com 120 μ M de ácido ascórbico foi observado $644,5 \pm 60,5$ RFU ($p=0,0137$) (Figura 21).

Não houve diferença estatística significativa entre os tratamentos utilizados quando comparados com a menor concentração de heme (30 μ M), nem o heme exerceu efeito estatisticamente significativo nas culturas quando o teste t foi utilizado. A análise por ANOVA mostrou que entre as concentrações de sinvastatina associadas com o heme houve diferença ($p= 0,0240$), entre as concentrações de HU associadas com o heme houve diferença ($p= 0,0460$); e entre as concentrações de ácido ascórbico também houve diferença ($p= 0,0242$) (Figura 22).

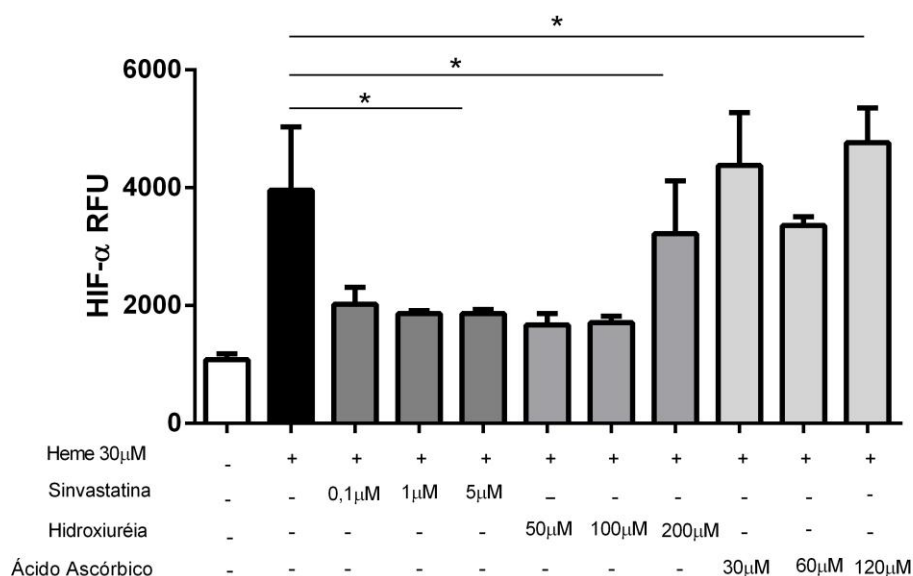


Figura 22. Efeito dos tratamentos e do estímulo com 30 μ M de heme para produção de HIF- α células HUVEC, $n=3$, média das triplicatas, $*p<0,05$ (ANOVA).

5.5.1 Efeito da hidroxiuréia na produção de HIF- α pelas células HUVEC estimuladas com heme

A intensidade da fluorescência de HIF- α foi de $2775,5 \pm 192,5$ RFU ($p=0,0003$) nas culturas em que as células foram estimuladas com $50\mu\text{M}$ de heme. Todos os tratamentos influenciaram a produção do fator transcricional. O tratamento das células HUVEC com HU e estímulo com $50\mu\text{M}$ de heme reduziu a produção de HIF- α após o tratamento com $100\mu\text{M}$ de HU (1877 ± 15 RFU; $p=0,0013$). As outras concentrações de HU utilizadas não exerceram efeito significativo na produção de HIF- α (Figura 23a). Ao utilizar a maior concentração de heme ($70\mu\text{M}$) para estimular as células, a intensidade de fluorescência de HIF- α foi de 4351 ± 1109 RFU ($p=0,0072$). A HU reduziu a expressão do HIF- α frente ao estímulo com $70\mu\text{M}$ de heme, no entanto apenas quando a maior concentração foi utilizada ($200\mu\text{M}$) (2505 ± 234 RFU, $p=0,0478$). As concentrações mais baixas da droga não reduziram de maneira estatisticamente significativa a produção de HIF- α (Figura 23b).

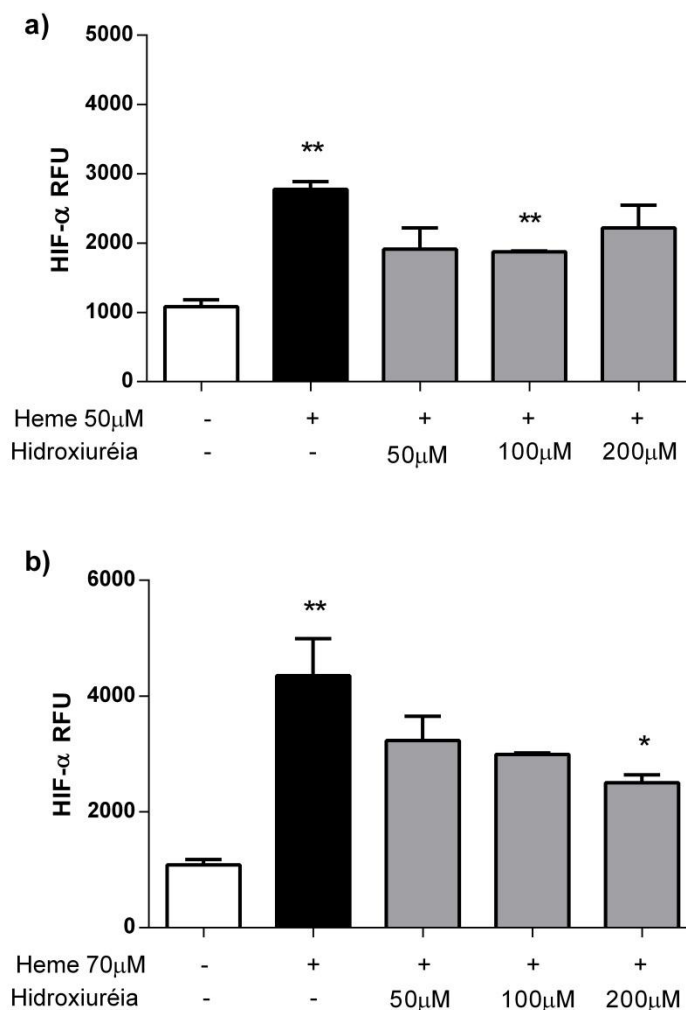


Figura 23. Efeito da hidroxiuréia e do estímulo com concentrações crescentes de heme (50μM, 70μM) na produção de HIF-α pelas células HUVEC, em comparação com a ausência de tratamento, n=3, média das triplicatas, *p<0,05; **p<0.01; ***p<0,001 (teste t independente).

5.5.2 Efeito da sinvastatina na produção de HIF-α pelas células HUVEC estimuladas com heme

Quando as células HUVEC foram estimuladas com 50μM de heme e tratadas com 0,1μM de sinvastatina houve produção de $1654,5 \pm 91,5$ RFU para o HIF- α, e quando foram tratadas com 1μM de sinvastatina produziram $2134,5 \pm 129,5$ RFU, tratamento estatisticamente significativo na redução do HIF-α (p=0,0008 e p=0,0087, respectivamente). A maior concentração de sinvastatina utilizada não reduziu a produção de HIF-α (Figura 24a). O

tratamento simultâneo com sinvastatina em concentração 0,1 μ M frente ao estímulo com 70 μ M de heme diminuiu a produção do HIF- α para 1811 ± 37 RFU ($p=0,0166$), bem como na concentração de 1 μ M, que reduziu para $2155,5 \pm 71,5$ RFU ($p=0,0267$) (Figura 24b).

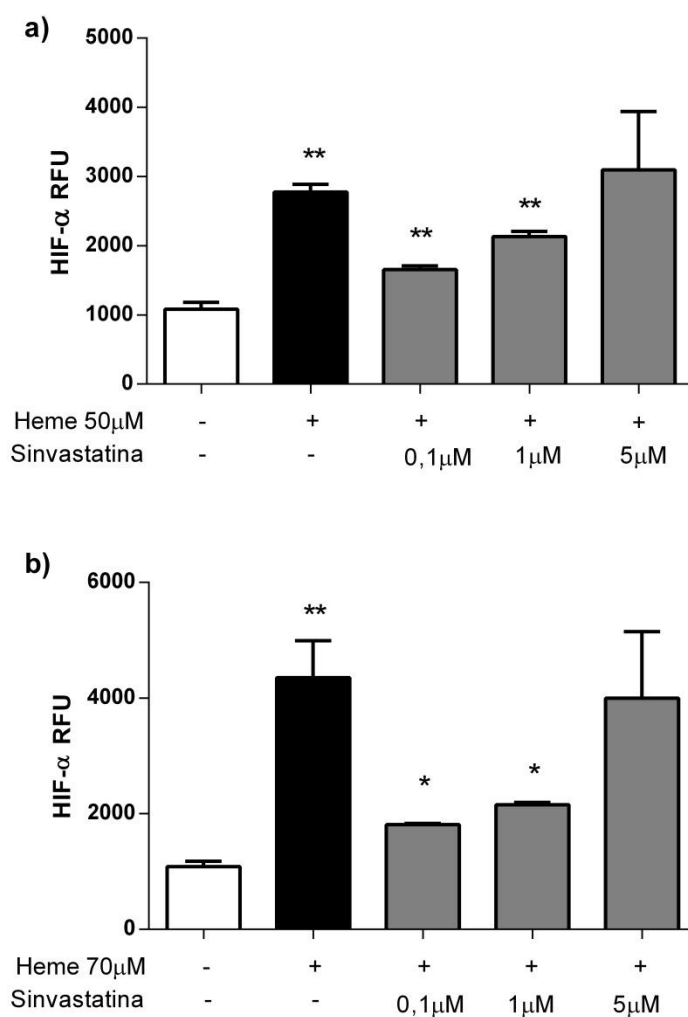


Figura 24. Efeito da sinvastatina e do estímulo com concentrações crescentes de heme (50 μ M, 70 μ M) na produção de HIF- α pelas células HUVEC, em comparação com a ausência de tratamento, $n=3$, média das triplicatas, * $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$ (teste t independente).

5.5.3 Efeito do ácido ascórbico na produção de HIF- α pelas células HUVEC estimuladas com heme

O ácido ascórbico aumentou de maneira significativa a produção do HIF- α . Quando as células foram estimuladas com 50 μ M de heme e tratadas com 30 μ M de ácido ascórbico, a intensidade de fluorescência para o HIF- α foi 4512 \pm 922 RFU, com 60 μ M foi 4942,5 \pm 512,5 ($p=0,0331$ e $p=0,0024$, respectivamente), contudo, com 120 μ M de ácido ascórbico a produção foi diminuída para 1971 \pm 238 RFU ($p=0,0104$) (Figura 25a). Ao utilizar a maior concentração de heme (70 μ M) para estimular as células, o ácido ascórbico não reduziu a produção quando foi usado concomitantemente com a esta concentração (Figura 25b).

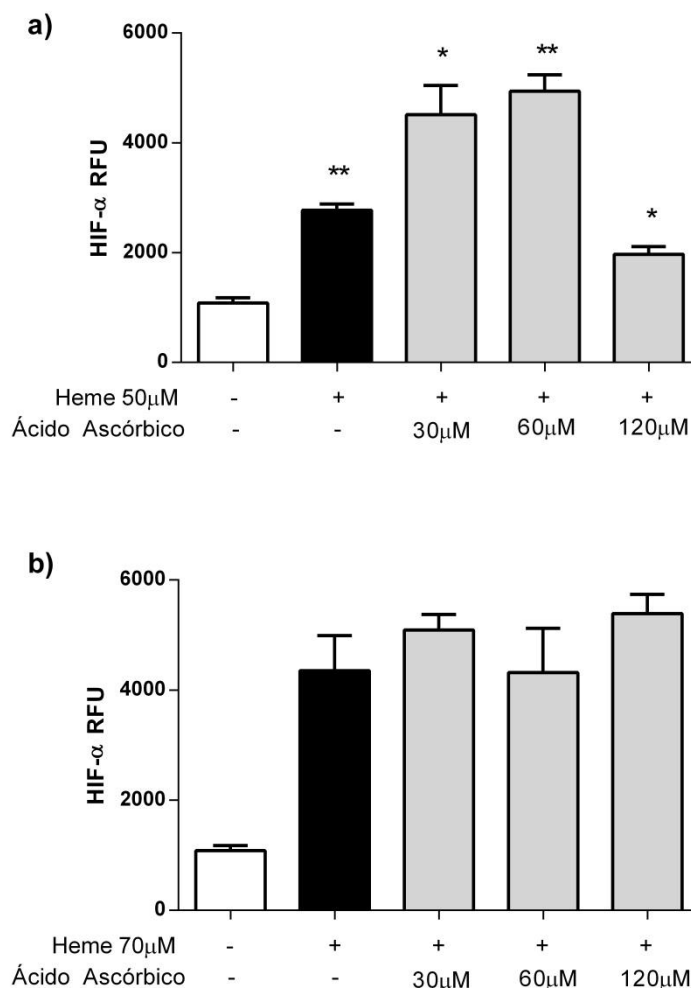


Figura 25. Efeito do ácido ascórbico e do estímulo com concentrações crescentes de heme (50 μ M, 70 μ M) na produção de HIF- α pelas células HUVEC, em comparação com a ausência de tratamento, $n=3$, média das triplicatas, * $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$ (teste t independente).

5.5.4 Efeito das combinações dos tratamentos na produção de HIF- α pelas células HUVEC estimuladas com heme

Os tratamentos combinados influenciaram também na produção de HIF- α pelas células HUVEC. Foi observada diferença significativa ao comparar o tratamento com HU e suas combinações com todas as drogas ($p=0,0016$), com sinvastatina e HU ($p<0,0001$) e com HU e ácido ascórbico ($p<0,0001$) (Figura 26a). Foi observada diferença significativa também entre o tratamento das células estimuladas com 70 μ M de heme e tratadas com sinvastatina, e o tratamento com todas as drogas ($p=0,0006$), com sinvastatina e HU ($p<0,0001$) e com HU e ácido ascórbico ($p<0,0001$) (Figura 26b).

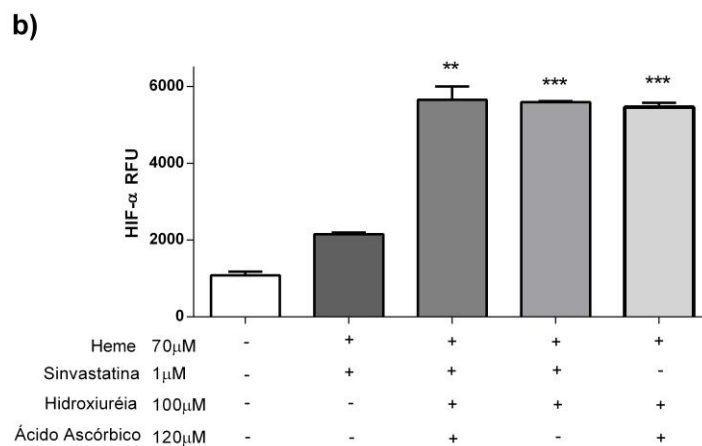
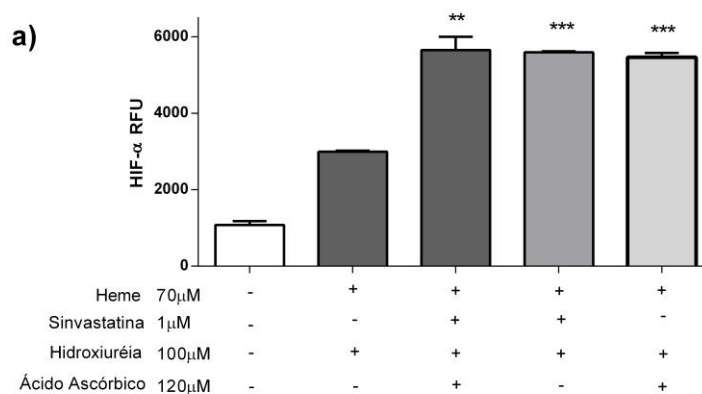


Figura 26. Efeito da combinação dos tratamentos e do estímulo com heme na produção de HIF- α pelas células HUVEC a) em comparação com o tratamento apenas com hidroxauréia; b) em comparação com o tratamento apenas com sinvastatina, n=3, média das triplicatas, *p<0,05; **p<0.01; ***p<0,001 (teste t independente).

6. DISCUSSÃO

A vasculopatia e a disfunção endotelial são as alterações mais importantes entre os eventos crônicos descritos na AF, uma vez que têm participação na ocorrência de AVC, doença renal e hipertensão pulmonar. A fisiopatologia da AF está intimamente relacionada aos eventos hemolíticos e a disfunção endotelial vascular, embora vários outros processos inter-relacionados também sejam igualmente importantes (REES e GIBSON, 2011).

O papel fisiopatológico da homeostasia desregulada do NO e o aumento da adesão dos reticulócitos estão associados a hemólise e a vasculopatia na AF. Quando a Hb é liberada intravascularmente dos eritrócitos falciformes lisados, há o consumo do NO, e o equilíbrio fisiológico entre vasoconstrição e vasodilatação é rompido, com predomínio da vasoconstrição. A hipertensão pulmonar, o priapismo, as úlceras de perna e o AVC, são alterações clínicas associadas a subfenótipos específicos da AF e estão relacionadas com a intensidade da hemólise. Todavia, a hemólise contribui de maneira menos significativa nas complicações causadas por VOC ou aumento da viscosidade sanguínea, como nas crises de dor, osteonecrose e STA. Mesmo havendo dicotomização dos subfenótipos clínicos dos pacientes com AF, frequentemente o subfenótipo hemolítico se sobrepõe ao subfenótipo vaso-oclusivo e viscoso, podendo ocorrer de forma simultânea (KATO et al., 2007).

Os eventos hemolíticos na AF são frequentes e muitas vezes ocorrem de maneira crônica. A lise dos eritrócitos causa a liberação do seu conteúdo intracitoplasmático nos espaços vasculares, com liberação de heme, Hb e arginase (WAGENER et al., 2001). O heme é produto da degradação das hemeproteínas, e por ter características hidrofóbicas, pode se localizar na membrana das células. Em modelo murino de AF, os autores avaliaram as concentrações plasmáticas de heme nos camundongos no estado estável da doença, e identificaram que no modelo HbSS-Townes, o heme foi encontrado nas concentrações de $52,6 \pm 18,3\mu\text{M}$, e no HbAA-Townes estas concentrações foram de $28,8 \pm 3,1\mu\text{M}$ (BELCHER et al., 2014), semelhante ao que foi

encontrado em nossos estudos (SEIXAS et al., 2014). O heme liberado da Hb no plasma pode lesar a integridade da membrana celular endotelial por modificações oxidativas do LDL (JENEY et al., 2002), danos ao DNA e desnaturação de proteínas (KUMAR e BANDYPOADHYAY, 2005).

As células endoteliais podem sofrer ativação provocada pelo heme liberado nos eventos de hemólise. Devido a sua proximidade com a Hb descompartimentalizada e dos locais de lesão por isquemia e reperfusão, o endotélio é o maior alvo de estresse oxidativo na AF. Diversos mecanismos relacionados ao estresse oxidativo contribuem com a lesão endotelial, o que representa uma função central em complicações nos órgãos como a vasculopatia cerebral, hipertensão pulmonar e retinopatia (NUR et al., 2011; NUR et al., 2010; KATO et al., 2009).

Devido ao ambiente inflamatório crônico estabelecido na AF, várias terapias têm sido propostas para o acompanhamento dos pacientes, mas a HU é o único tratamento farmacológico aprovado para uso. Por isso, é fundamental a busca por novas abordagens terapêuticas que sejam capazes de melhorar o status inflamatório e o quadro clínico dos pacientes, mesmo com a existência dos diversos subfenótipos.

6.1. EFEITOS DA HIDROXIURÉIA

A HU é o único fármaco oficialmente disponível para o tratamento de pacientes com AF. A droga é inibidora da enzima ribonucleotídeo redutase, interferindo na conversão de ribonucleotídeos em desoxirribonucleotídeos (LOPES et al., 2014; MALUF et al., 2009), é um agente quimioterápico específico que interrompe a fase S do ciclo celular e promove a hipometilação do DNA, dessa forma sendo capaz de aumentar os níveis de HbF (ATWEH e LOUKOPOULOS, 2001). Além disso, já foram descritos efeitos da HU na produção de NO (RUPON et al., 2000; PACELLI et al., 1996), na modulação da

enzima eNOS (COKIC et al., 2007), na angiogênese (LOPES et al., 2014), e no perfil pró-coagulatório de leucócitos polimorfonucleares (MAUGERI et al., 2006). Observações clínicas e epidemiológicas de pacientes com AF sob o tratamento com HU mostram que há melhora no quadro clínico, o que pode ser justificado pela contribuição do aumento na HbF em reduzir a polimerização da HbS desoxigenada (ATWEH e LOUKOPOULOS, 2001; POILLON et al., 1993).

No presente estudo, a HU não provocou efeito na produção de nitrito pelas células endoteliais quando esta foi utilizada como estímulo único. Por outro lado, quando foi utilizada em associação com o heme houve redução discreta na produção de nitrito pelas células, nas maiores concentrações do estímulo. Sabe-se que a interação entre a HU e o heme pode levar a produção de óxido nítrico (RUPON et al., 2000; PACELLI et al., 1996), o que explica em parte sua ação benéfica na AF. No entanto, não foi verificado nos ensaios aumento na produção de nitrito pelas células quando tratadas com HU.

Apesar de não ter sido verificado efeito da HU na produção de nitrito pelas células endoteliais, o tratamento aumentou a produção da enzima eNOS. Quando a cultura foi tratada apenas com HU sem o estímulo do heme, foi observado aumento da eNOS de maneira dose-dependente. Nos testes em que as células foram estimuladas com heme e tratadas com HU, também foi observado aumento da eNOS. Este efeito está de acordo com o encontrado em estudo prévio (COKIC et al., 2007), que propõe que a HU atua no aumento dos níveis da eNOS por um mecanismo que protege a enzima da degradação pelo proteassoma, mesmo em concentrações mais baixas do que as que foram utilizadas neste estudo. Mesmo atuando nesse possível mecanismo de aumentar a disponibilidade de NO por prevenir a degradação precoce da eNOS, esse efeito não foi verificado na dosagem indireta de óxido nítrico. Possivelmente, o efeito do heme foi superior à ação protetora da HU.

A HU também exerceu efeito ao diminuir a produção de FT pela HUVEC, na ausência de heme. A inibição causada pela HU na expressão de FT já foi verificada em outros tipos celulares. Em estudo conduzido por Maugeri e colaboradores (2006), no qual neutrófilos de pacientes com trombocitopenia essencial e policitemia vera foram avaliados quanto a expressão do FT, foi

verificado que após o tratamento dos pacientes com HU houve redução na expressão do FT. O mesmo estudo observa que quando os polimorfonucleares provenientes de indivíduos saudáveis são estimulados com P-selectina e tratados com HU também ocorreu redução na porcentagem de células que expressam o FT. A avaliação por citometria de fluxo, em outro estudo, demonstrou que o tratamento com HU reduz a expressão de CD36 e $\alpha_4\beta_1$ (VLA-4) em reticulócitos (REES e GIBSON, 2011; STYLES et al., 1997). Com base nesses argumentos, sugerimos então que o efeito do tratamento é semelhante ao que ocorre no endotélio atuando em diferentes tipos celulares. Desse modo, a HU melhora o quadro clínico pró-coagulatório de doenças mieloproliferativas, e causa efeito também no microambiente hemolítico da AF, reduzindo a disfunção hemostática.

O HIF- α é um fator transcricional que regula genes de enzimas e proteínas envolvidas na glicólise, transporte de ferro, angiogênese, sobrevivência celular e apoptose (VISSERS et al., 2007; WENGER, 2002; LANDO et al., 2003; KAELIN, 2005). O tratamento das células endoteliais com HU também modulou a produção do fator transcricional HIF- α . Foi observada redução na produção do HIF- α quando as menores concentrações de HU foram utilizadas, já com a concentração mais elevada de HU nas culturas, houve aumento discreto do HIF- α . Quando as células foram estimuladas com 50 μ M de heme e tratadas com HU, a produção de HIF- α foi reduzida. Uma vez que a maior concentração de heme foi adicionada, houve diminuição da resposta de maneira dose-dependente. A expressão gênica do HIF- α foi analisada por Lopes e colaboradores (2014) que demonstraram também que houve redução quando a HUVEC foi tratada com 100 μ M de HU. O HIF- α controla diversos genes relacionados ao metabolismo das células endoteliais, inclusive os responsáveis por regular a angiogênese. No mesmo estudo, os pesquisadores verificaram ação inibitória da HU *in vivo*, submetendo *plugs* adsorvidos da droga a serem revascularizados, sendo que o tratamento com HU impediu a angiogênese. Por isso, a interação com o HU e o heme livre nas culturas é útil para elucidar mecanismos pró- ou anti-angiogênicos presentes na AF.

6.2. EFEITOS DA SINVASTATINA

As estatinas constituem um grupo de drogas que inibem seletivamente a enzima 3-hidroxi-3-metil-glutaril coenzima A redutase (HMG-CoA redutase), limitando a biossíntese de colesterol e diminuindo as concentrações hepáticas. O resultado é o aumento dos receptores para LDL na membrana celular dos hepatócitos com a subsequente redução das partículas circulantes de colesterol LDL do sangue (SIRTORI, 2014). Deste esse modo, são as drogas de escolha para o tratamento de doenças cardiovasculares (BLANCO-COLIO et al., 2003). Além da atuação em reduzir o colesterol, sugere-se que as estatinas também possuem propriedades anti-inflamatórias (BLANCO-COLIO et al., 2003; DICHTL et al., 2003). Um estudo piloto com o uso de sinvastatina em pacientes com AF demonstrou redução nos níveis de proteína C reativa (PCR) e interleucina-6 (IL-6) nos pacientes sob o tratamento, com o restabelecimento dos níveis mais elevados dessas moléculas após a interrupção do tratamento (HOPPE et al., 2011), demonstrando função promissora no tratamento da doença. Outros efeitos das estatinas já foram descritos, tais como papel protetor em infecções em modelo murino de AF (ROSCH et al., 2010), modulador da angiogênese (KUREISHI et al., 2000; ZHU et al., 2008), e modulador da expressão de moléculas de adesão (CANALLI et al., 2011; SOLOVEY et al., 2004).

No presente estudo, a sinvastatina não exerceu efeito extenso sobre a produção de nitrito pelas células endoteliais. Apenas quando houve co-incubação com a concentração intermediária de heme foi observada redução na produção de nitrito. O mecanismo pelo qual a sinvastatina influencia a produção e a ativação da eNOS ainda não foi completamente esclarecido, uma vez que Kureishi e colaboradores (2000) verificaram que as estatinas aumentam a fosforilação da eNOS; porém, Zhu e colaboradores (2008) não observaram o mesmo resultado. No presente estudo a sinvastatina quando utilizada em concentrações mais baixas e na ausência de heme elevou a produção de eNOS. Nos ensaios realizados na presença do heme a produção de eNOS também foi aumentada. Todavia, mesmo com o aumento provocado

pela sinvastatina na produção da enzima, a produção de nitrito não sofreu modificações. Isso pode ser justificado por um mecanismo de aumento compensatório da enzima sem conseguir atingir níveis detectáveis pelo método de Griess, ou a produção compensatória fornecida pela sinvastatina pode não ser suficiente para provocar efeito biológico nas culturas.

A produção de FT pelas células endoteliais pode ser aumentada mediante estímulos inflamatórios. As propriedades anti-inflamatórias das estatinas não foram absolutamente capazes de reverter os efeitos do heme na produção de FT nas culturas de HUVEC. Com a ausência de heme, a sinvastatina aumentou a produção de FT em comparação com a ausência de estímulos. Apenas na concentração mais elevada de heme foi demonstrado efeito redutor na produção de FT de maneira dose-dependente, sendo que a maior dose de sinvastatina provocou a menor produção de FT. A expressão de FT pelas células endoteliais pode acontecer por estímulos inflamatórios, interações entre as células, lesão endotelial e em situações de hipóxia e reperfusão (SOLOVEY et al., 2004; SETTY et al., 2008). Em estudo com modelo murino de AF induzindo hipóxia nos animais, foi verificado o aumento na expressão de FT em células endoteliais, fibroblastos, células musculares lisas e monócitos (SOLOVEY et al., 2004), especialmente no ambiente endotelial vascular do pulmão. O tratamento com lovastatina reduziu a produção da glicoproteína pelas células endoteliais, fibroblastos e células musculares lisas, porém não houve ação nos monócitos, resultado diferente do encontrado por Maugeri e colaboradores (2006), ao tratar monócitos com HU. A heterogeneidade dos resultados pode ser justificada pela especificidade das células nos tecidos dos diferentes órgãos. Em células endoteliais e células musculares lisas, sabe-se que as estatinas reduzem a ativação de fatores de transcrição como o NF- κ B e o AP-1, o que corrobora a ação anti-inflamatória dessas drogas (DICHTL et al., 2002). Porém, por exemplo, o endotélio vascular do pulmão recebe o maior aporte de hemácias com alterações na membrana e em processo de falcização, por esse motivo, possivelmente, estará mais ativado. Diferenças metabólicas entre os órgãos e o grau de perfusão é um fator a ser considerado na avaliação da atuação das estatinas e de suas propriedades anti-inflamatórias (EL-AZAB et al., 2012; DICHTL et al., 2002).

O papel das estatinas na angiogênese também já foi descrito. O principal fator transcricional da angiogênese é o HIF- α , que regula os genes envolvidos também no metabolismo da glicose nas células endoteliais. As estatinas modulam o HIF- α de diferentes maneiras, sendo que em células musculares lisas e células endoteliais as estatinas provocam inibição do HIF- α (DICHTL et al., 2002). Entretanto, em estudo conduzido por El-Azab e colaboradores (2012) foi verificado que a sinvastatina em associação com a vitamina C promove a angiogênese em modelo de diabetes experimental, atuando ao aumentar os níveis de fator de crescimento vascular endotelial (VEGF), que é controlado pelo HIF- α . Em estudo feito por Zhu e colaboradores (2008), os pesquisadores demonstraram que a sinvastatina pode inibir ou aumentar o HIF- α a depender do estímulo que as células endoteliais recebam. Quando as células estão em situação de hipóxia e são reoxigenadas com a presença de sinvastatina, ocorre aumento do HIF- α . Uma vez que as células foram estimuladas pelo TNF- α , no entanto, houve inibição do HIF- α . Entretanto, evidências sugerem que a angiogênese, a inflamação crônica e as respostas celulares à tensão de oxigênio são codependentes (LOPES et al., 2014). Sabe-se que lesões induzidas por hipóxia e reperfusão constituem mecanismos fortemente inflamatórios, e a hipóxia por si só já é um fator ativador do HIF- α .

A angiogênese é um processo complicado, multifatorial, marcada pela ação de moléculas que podem apresentar efeito antagonista (HEBBEL et al., 2004). A atuação ímpar da sinvastatina na angiogênese ainda precisa ser elucidada no contexto da AF, pois ambos os estímulos de hipóxia e inflamação estão presentes, de maneira crônica. No atual estudo a sinvastatina reduziu a expressão de HIF- α , na ausência de heme, em todas as concentrações usadas. Quando o heme foi adicionado às células, na presença de concentrações reduzidas da sinvastatina este apresentou efeito inibitório do HIF- α . A partir desse resultado podemos sugerir que a sinvastatina contribuiria de maneira inibitória no microambiente hemolítico vascular da AF. Contudo, as características inflamatórias da doença são mais complexas, e fatores pró-angiogênicos estão elevados no soro dos pacientes (BRITTAİN et al., 2010), mesmo com esses fatores elevados, os pacientes apresentam lesões ulcerativas crônicas. Portanto, o papel da angiogênese na AF e sua regulação

pela sinvastatina ainda precisa de estudos mais aprofundados para ser elucidado. Embora os estudos com antioxidantes em diabetes e outras doenças cardiovasculares tenham mostrado resultados conflitantes, a AF é única no que diz respeito à carga sistêmica de ROS que se inicia no primeiro ano de vida e persiste com intensidade elevada durante toda a vida do paciente. Logo, o benefício de um tratamento com antioxidantes na AF poderá ser mais promissor quando comparado, por exemplo, com a terapia antioxidante de pacientes que já apresentam manifestações clínicas de aterosclerose (NUR et al., 2011).

6.3. EFEITOS DO ÁCIDO ASCÓRBICO

O ácido ascórbico é uma vitamina hidrossolúvel com propriedades antioxidantes que é acumulada no interior das células. Cada tipo celular em seu respectivo órgão acumula o ácido ascórbico em diferentes concentrações. A concentração plasmática de vitamina C na forma de ácido ascórbico é da ordem de 50µM, com magnitude muito maior no meio intracelular e nos tecidos (LINSTER e VAN SCHAFTINGEN, 2007), indicando que a vitamina C está concentrada nos compartimentos celulares de cada órgão (MONTECINOS et al., 2007). Algumas células como as adrenais e o cérebro, que sintetizam hormônios hidroxilados ou neurotransmissores acumulam até 20mM de ascorbato, enquanto células do sistema imune, fígado, rins e células musculares acumulam de 1 a 10mM (VISSERS et al., 2007; HORNIG, 1975; BUTLER et al., 1991)

Nas células endoteliais o ácido ascórbico tem capacidade de melhorar quadros de disfunção endotelial (MONTECINOS et al., 2007; CÁRCAMO et al., 2002), o que constitui um aspecto importante de ser estudado na vasculopatia da AF. A capacidade das células endoteliais em sobreviver ao desafio com H₂O₂ está relacionado com a capacidade das células em recuperar a glutathiona, e esse processo é acelerado quando as células são tratadas com ácido ascórbico (MONTECINOS et al., 2007). Já em estudo realizado para

avaliar o grau de oxidação de hemeproteínas do fígado em modelo animal, a oxidação induzida pelo Fe^{2+} foi diminuída pela dieta com selênio e vitamina E, e foi reduzida ainda mais com a associação de outras vitaminas hidrossolúveis e lipossolúveis, inclusive a vitamina C (CHEN e TAPPEL, 1994). A partir disso, pode-se verificar que o mecanismo de ação antioxidante do ácido ascórbico é comum em diferentes tipos celulares.

A produção de nitrito pelas células HUVEC, na ausência de heme, demonstrou aumento discreto quando avaliada apenas com o ácido ascórbico. Nos ensaios em que houve a adição de heme, o ácido ascórbico provocou redução na produção de nitrito pelas células. O ácido ascórbico foi associado à proteção da molécula tetraidrobiopterina (BH_4), o que conserva a atividade da enzima eNOS e, conseqüentemente, aumenta a disponibilidade de NO (KUZKAYA et al., 2003). A interação do heme com o ácido ascórbico no presente estudo, no entanto, não demonstrou efeito no aumento da produção de nitrito pelas culturas, ao contrário, um pequeno decréscimo foi identificado.

Em estudos realizados por Heller e colaboradores (1999) e por Kuzkaya e colaboradores (2003) foi verificado que o ácido ascórbico aumenta a produção da enzima eNOS. As propriedades antioxidantes do ácido ascórbico já foram atribuídas a capacidade de remover radicais livres, o que poderia também preservar o NO da degradação. Nos ensaios, sem heme, o ácido ascórbico aumentou a produção da enzima, e mediante estímulo com heme houve redução. Tal ação pode ser justificada pela característica pró-oxidante do heme e presença do ferro, que pode não ter sido ultrapassada pelo efeito benéfico do ácido ascórbico.

A produção de FT pelas células quando tratadas com ácido ascórbico foi aumentada. A concentração intermediária de ácido ascórbico promoveu produção do FT de maneira similar a maior concentração de heme utilizada. Nos ensaios em que havia a presença do heme, a associação com ácido ascórbico promoveu a diminuição da produção de FT. O heme já foi descrito como molécula que proporciona ativação endotelial pela produção de FT pelas células HUVEC (SETTY et al., 2008), o que pode contribuir com o perfil pró-coagulatório da AF, ajudando a perpetuar crises vaso-oclusivas precedidas por

hemólise. Foi demonstrado no mesmo estudo que o heme ativa as células endoteliais diretamente, de maneira independente das citocinas pró-inflamatórias IL-1 α e TNF- α , uma vez que o bloqueio dessas citocinas não reverteu a expressão de FT pelas células. A expressão induzida pelo heme pode se relacionar ao mecanismo fisiopatológico entre o ambiente hemolítico intravascular e as alterações hemostáticas observadas nas anemias hemolíticas, como a AF (SETTY et al., 2008). A co-incubação do heme com o ácido ascórbico levou a diminuição da produção de FT, o que pode ter relação com as propriedades inibitórias do ácido ascórbico em culturas de células (CÁRCAMO et al., 2002). De acordo com o que foi observado no presente estudo é possível sugerir que o ácido ascórbico atue de maneira inibitória na produção de FT nas células endoteliais HUVEC.

O fator transcricional HIF- α é regulado por enzimas hidroxilases, que podem marcá-lo para degradação pelo proteassomo ou impedir a montagem do complexo transcricional (VISSERS et al., 2007). O ácido ascórbico aumenta a atividade das hidroxilases (SCHOFIELD e RATCLIFFE, 2004) o que *in vitro* pode contribuir com a redução na produção do HIF- α pelas células HUVEC. Desse modo, nos cultivos sem heme o ácido ascórbico de fato reduziu a quantidade de HIF- α . Quando foi adicionado heme aos ensaios, o HIF- α sofreu aumento da produção, indicando que o estímulo oxidante ou inflamatório do heme foi superior à capacidade do ácido ascórbico em reduzir HIF- α . Apenas em um experimento, e com a maior concentração de ácido ascórbico utilizada foi induzida a redução do HIF- α . O uso de ácido ascórbico em experimentos *in vitro* pode causar efeitos conflitantes, devido à taxa de acumulação intracelular e a habilidade do ácido ascórbico em atuar como pró-oxidante na presença de metais de transição livres (como o ferro), encontrados nos meios de cultura (CÁRCAMO et al., 2002; CLEMENT et al., 2001; CAI et al., 2001). A internalização da vitamina C pelas células depende de algumas condições da cultura, e em especial do tipo de ácido ascórbico usado nas culturas. Alguns tipos celulares transportam a vitamina C diretamente como ácido ascórbico, via de co-transporte com o sódio (TSKUGACHI et al., 1999). Entretanto, todas as células podem transportar a forma oxidada da vitamina C, o ácido deidroascórbico (DHA) através dos receptores de glicose (GLUTs) (VERA et

al., 1994), GLUT-1, GLUT-3 e GLUT-4 (MONTECINOS et al., 2007). Já foi descrito que o tratamento das células com o DHA previne efeitos pró-oxidantes potenciais do ácido ascórbico em cultura de células (CLEMENT et al., 2001; FISHER et al., 2003; DHAR-MASCAREÑO et al., 2005). Acredita-se que as células endoteliais vasculares internalizem mais facilmente a forma oxidada do ácido ascórbico o DHA, que virtualmente utiliza os mesmos transportadores de glicose que as células expressam, sendo desta forma mais facilmente internalizada. Já o ácido ascórbico não oxidado (L-ascorbato) dispõe de menos receptores celulares, o que implica em disponibilidade menor nas culturas e, conseqüentemente, menor efeito benéfico será verificado (DHAR-MASCAREÑO et al., 2005).

7. CONCLUSÕES

- A produção de fator tecidual pelas células HUVEC foi influenciada pelo ácido ascórbico e pela HU, e também pela associação entre os dois tratamentos, sugerindo um possível mecanismo de redução das alterações hemostáticas;
- A produção de nitrito pelas células HUVEC foi aumentada mediante estímulo com heme e reduzida quando houve tratamento com HU. Os mecanismos de produção de nitrito, óxido nítrico ou peroxinitrito pelas células quando influenciadas pelas drogas ainda precisa ser melhor caracterizado;
- A produção de eNOS quando as células foram estimuladas com heme foi heterogênea, e a interação entre o heme e as drogas na produção da enzima precisa ser melhor caracterizado com o objetivo de compreender os mecanismos de disfunção endotelial;
- A produção do HIF- α em estímulo com heme foi aumentada, porém os tratamentos com sinvastatina e ácido ascórbico ainda precisam ser mais bem compreendidos, uma vez que essas drogas possuem diferentes mecanismos de ação.

REFERÊNCIAS

ADISA, O. A. et al. Association between plasma free haem and incidence of vaso-occlusive episodes and acute chest syndrome in children with sickle cell disease. **Br. J. Haematol.**, v. 162, n. 5, p. 702-705, 2013.

ADORNO, E. V. et al. Hemoglobinopathies in newborns from Salvador, Bahia, Northeast Brazil. **Cad. Saude Publ.**, v. 21, n. 1, p. 292-298, 2005.

ALMEIDA, C. B. et al. Alterations in cell maturity and serum survival factors may modulate neutrophil numbers in sickle cell disease. **Exp. Biol. Med.**, v. 236, n. 11, p. 1239-1246, 2011.

ARAUJO, F. V. F. et al. Heterogeneous fenton process using the mineral hematite for the discolouration of a reactive dye solution. **Braz. J. Chem. Eng.**, v. 28, n. 4, p. 605-616, 2011.

ARRUDA, M. A. et al. Heme inhibits human neutrophil apoptosis: involvement of phosphoinositide 3-kinase, MAPK, and NF-kappaB. **J. Immunol.**, v. 173, n. 3, p. 2023-2030, 2004.

ASLAN, M. et al. Oxygen radical inhibition of nitric oxide-dependent vascular function in sickle cell disease. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v. 98, n. 26, p. p. 15215-15220, 2001.

ATWEH, G. F.; LOUKOPOULOS, D. Pharmacological induction of fetal hemoglobin in sickle cell disease and beta-thalassemia. **Semin. Hematol.** v. 38, n. 4, p. 367-373, 2001.

AZEVEDO, E. S. et al. Distribution of abnormal hemoglobins and glucose-6-phosphate dehydrogenase variants in 1200 school children of Bahia, Brazil. **Am. J. Phys. Anthropol.**, v. 53, n. 4, p. 509-512, 1980).

BALLA, G. et al. Exposure of endothelial cells to free heme potentiates damage mediated by granulocytes and toxic oxygen species. **Lab. Invest.**, v. 64, n. 5, p. 648-655, 1991.

BALLA, G. et al. Hemin: a possible physiological mediator of low density lipoprotein oxidation and endothelial injury. **Arterioscler. Thromb.**, v. 11, n. 6, p. 1700-1711, 1991.

BALLAS, S. K.; DELENGOWSKI, A. Pain measurement in hospitalized adults with sickle cell painful episodes. **Ann. Clin. Lab. Sci.** v. 23, n. 5, p. 358-361, 1993.

BANDEIRA, F. M. et al. Hemoglobin "S" positive newborn detected by cord blood and its characteristics **J. Pediatr.**, v. 75, n. 3, p. 167-171, 1999.

BANDEIRA, I. C. et al. Chronic inflammatory state in sickle cell anemia patients is associated with HBB(*)S haplotype **Cytokine**, v. 65, n. 2, p. 217-221, 2014.

BANHEGYI, G. et al. Ascorbate metabolism and its regulation in animals **Free Radic. Biol. Med.**, v. 23, n. 5, p. 793-803, 1997.

BECKER, B. F. et al. Endothelial function and hemostasis. **Z. Kardiol.**, v. 89, n. 3, p. 160-167, 2000.

BECKMAN, J. S.; KOPPENOL, W. H. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. **Am. J. Physiol.**, v. 271, n. 5 pt 1, C1424-1437, 1996.

BELCHER, J. D. et al. Heme triggers TLR4 signaling leading to endothelial cell activation and vaso-occlusion in murine sickle cell disease **Blood**, v. 123, n. 3, p. 377-390, 2014.

BELCHER, J. D. et al. Heme degradation and vascular injury **Antioxid. Redox. Signal.**, v. 12, n. 2, p. 233-248, 2010.

BELCHER, J. D. et al. Activated monocytes in sickle cell disease: potential role in the activation of vascular endothelium and vaso-occlusion **Blood**, v. 96, n. 7, p. 2451-2459, 2000.

BENZ, E. J. Hemoglobin structure and synthesis. In: BENNETT, J. C.; PLUM, F. (eds). **Cecil Textbook Med.**, 20th ed., WB Saunders Company, 1996. cap XIII, p. 960-988.

BLANCO-COLIO, L. M. et al. Anti-inflammatory and immunomodulatory effects of statins. **Kidney Int.**, v. 63, n. 1, p. 12-23, 2003.

BRITTAIN, J. E. et al. Placenta growth factor in sickle cell disease: association with hemolysis and inflammation **Blood.**, v. 115, n. 10, p. 2014-2020, 2010.

BROWNE, P. et al. The molecular pathobiology of cell membrane iron: the sickle red cell as a model **Free Radic. Biol. Med.**, v. 24, n. 6, p. 1040-1048, 1998.

BRYAN, N. S. e M. B. GRISHAM Methods to detect nitric oxide and its metabolites in biological samples **Free Radic. Biol. Med.**, v. 43, n. 5, p. 645-657, 2007.

BUNN, H. F. Pathogenesis and treatment of sickle cell disease. **N. Engl. J. Med.**, v. 337, n. 11, p. 762-769, 1997.

BUSSE, R.; A. MULSCH Calcium-dependent nitric oxide synthesis in endothelial cytosol is mediated by calmodulin **FEBS Lett.**, v. 265, n. 1-2, p. 133-136, 1990.

BUTLER, J. D. et al. Ascorbic acid accumulation in human skin fibroblasts. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 54, n. 6, suppl., p. 1144S-1146S, 1991.

CAI, L. et al. Roles of vitamin C in radiation-induced DNA damage in presence and absence of copper. **Chem. Biol. Interact.**, v. 137, n. 1, p. 75-88, 2001.

CAJADO, C. S. et al. IL-8 e TNF-Alfa: marcadores imunológicos no prognóstico da anemia falciforme: il-8 and tnf-alpha: immunological markers in sickle cell anemia prognostic. **Gaz. Méd. Bahia**, v. 80, n. 3, p. 56-61, 2010.

CAMERER, E. et al. Cell biology of tissue factor, the principal initiator of blood coagulation. **Thromb. Res.**, v. 81, n. 1, p. 1-41, 1996.

CANALLI, A. A. et al. Participation of Mac-1, LFA-1 and VLA-4 integrins in the in vitro adhesion of sickle cell disease neutrophils to endothelial layers, and reversal of adhesion by simvastatin. **Haematologica**, v. 96, n. 4, p. 526-533, 2011.

CARCAMO, J. M. et al. Vitamin C suppresses TNF alpha-induced NF kappa B activation by inhibiting I kappa B alpha phosphorylation **Biochemistry**, v. 41, n. 43, p. 12995-13002, 2002.

CARR, A.; B. FREI Does vitamin C act as a pro-oxidant under physiological conditions? **FASEB J.**, v. 13, n. 9, p. 1007-1024, 1999.

CERQUEIRA, B. A.V. et al. 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. **Gaz. Méd. Bahia.**, v. 80, n. 3, p. 24-28, 2010.

CERQUEIRA, B. A. et al. Increased concentrations of IL-18 and uric acid in sickle cell anemia: contribution of hemolysis, endothelial activation and the inflammasome. **Cytokine**, v. 56, n. 2, p. 471-476, 2011.

CHARACHE, S. Mechanism of action of hydroxyurea in the management of sickle cell anemia in adults. **Semin. Hematol.**, v. 34, n. 3, suppl 3, p. 15-21, 1997.

CHARACHE, S. et al. Hydroxyurea and sickle cell anemia. Clinical utility of a myelosuppressive "switching" agent. The Multicenter Study of Hydroxyurea in Sickle Cell Anemia. **Medicine**, v. 75, n. 6, p. 300-326, 1996.

CHARACHE, S. et al. Hydroxyurea: effects on hemoglobin F production in patients with sickle cell anemia **Blood**, v. 79, n. 10, p. 2555-2565, 1992.

CHARACHE, S. et al. Effect of hydroxyurea on the frequency of painful crises in sickle cell anemia. Investigators of the Multicenter Study of Hydroxyurea in Sickle Cell Anemia **N. Engl. J. Med.**, v. 332, n. 20, p. 1317-1322, 1995.

CHEN, H.; TAPPEL, A. L. Protection by vitamin E selenium, trolox C, ascorbic acid palmitate, acetylcysteine, coenzyme Q, beta-carotene, canthaxanthin, and (+)-catechin against oxidative damage to liver slices measured by oxidized heme proteins **Free Radic. Biol. Med.**, v. 16, n. 4, p. 437-444, 1994.

CHEN, W., L. et al. Peroxynitrite induces destruction of the tetrahydrobiopterin and heme in endothelial nitric oxide synthase: transition from reversible to irreversible enzyme inhibition. **Biochemistry**, v. 49, n. 14, p. 3129-3137, 2010.

CHIANG, E. Y.; FRENETTE, P. S. Sickle cell vaso-occlusion. **Hematol. Oncol. Clin. North. Am.**, v. 19, n. 5, p. 771-784, 2005

CLEMENT, M. V. et al. The in vitro cytotoxicity of ascorbate depends on the culture medium used to perform the assay and involves hydrogen peroxide **Antioxid. Redox. Signal.**, v. 3, n. 1, p. 157-163, 2001.

COKIC, V. P. et al. Hydroxyurea increases eNOS protein levels through inhibition of proteasome activity. **Nitric Oxide**, v. 16, n. 3, p. 371-378, 2007.

CONRAN, N. et al. Inhibition of caspase-dependent spontaneous apoptosis via a cAMP-protein kinase A dependent pathway in neutrophils from sickle cell disease patients **Br. J. Haematol.**, v. 139, n. 1, p. 148-158, 2007.

COVAS, D. T. et al. Effects of hydroxyurea on the membrane of erythrocytes and platelets in sickle cell anemia. **Haematologica**, v. 89, n. 3, p. 273-280, 2004.

CROIZAT, H. Circulating cytokines in sickle cell patients during steady state. **Br. J. Haematol.**, v. 87, n. 3, p. 592-597, 1994.

DAWSON, J. H. Probing structure-function relations in heme-containing oxygenases and peroxidases. **Science**, v. 240, n. 4851, p. 433-439, 1988.

DHAR-MASCARENO, M. et al. Hypoxia-reoxygenation-induced mitochondrial damage and apoptosis in human endothelial cells are inhibited by vitamin C. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 38, n. 10, p. 1311-1322, 2005.

DICHTL, W. et al. HMG-CoA reductase inhibitors regulate inflammatory transcription factors in human endothelial and vascular smooth muscle cells. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, v. 23, n. 1, p. 58-63, 2003.

DUARTE, T. L. e J. LUNEC Review: When is an antioxidant not an antioxidant? A review of novel actions and reactions of vitamin C. **Free Radic. Res.**, v. 39, n. 7, p. 671-686, 2005.

DUTRA, F. F. et al. Hemolysis-induced lethality involves inflammasome activation by heme. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v. 111, n. 39, p. E4110-4118, 2014.

EL-AZAB, M. F. et al. Role of simvastatin and/or antioxidant vitamins in therapeutic angiogenesis in experimental diabetic hindlimb ischemia: effects on capillary density, angiogenesis markers, and oxidative stress. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 690, n. 1-3, p. 31-41, 2012.

FENG, C. et al. Intraprotein electron transfer between the FMN and heme domains in endothelial nitric oxide synthase holoenzyme. **Biochim. Biophys. Acta.** v. 1814, n. 12, p. 1997-2002, 2011.

FIGUEIREDO, R. T. et al. Characterization of heme as activator of Toll-like receptor 4. **J. Biol. Chem.**, v. 282, n. 28, p. 20221-20229, 2007.

FISHER, A. E.; NAUGHTON, D. P. Vitamin C contributes to inflammation via radical generating mechanisms: a cautionary note. **Med. Hypotheses.**, v. 61, n. 5-6, p. 657-660, 2003.

FRANCIS JR. R. B.; HAYWOOD, L. J. Elevated immunoreactive tumor necrosis factor and interleukin-1 in sickle cell disease. **J. Natl. Med. Assoc.**, v. 84, n. 7, p. 611-615, 1992.

FREI, B. et al. Ascorbate is an outstanding antioxidant in human blood plasma." **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v. 86, n. 16, p. 6377-6381, 1989.

GALIZA NETO, G. C.; PITOMBEIRA, M. S. Aspectos moleculares da anemia falciforme Molecular aspects for sickle cell anemia **J. Bras. Patol. Med. Lab.**, v. 39, n. 1, p. 51-56, 2003.

GHASEMI, A. et al. Side effects of hydroxyurea in patients with Thalassemia major and thalassemia intermedia and sickle cell anemia. **Iran. J. Ped. Hematol. Oncol.** v. 4, n. 3, p. 114-117, 2014.

GIULIVI, C. e E. CADENAS The reaction of ascorbic acid with different heme iron redox states of myoglobin. Antioxidant and prooxidant aspects. **FEBS Lett.**, v. 332, n. 3, p. 287-290, 1993.

GLADWIN, M. T. et al. Nitric oxide donor properties of hydroxyurea in patients with sickle cell disease. **Br. J. Haematol.**, v. 116, n. 2, p. 436-444, 2002.

GOLDBERG, M.A. et al. Hydroxyurea and erythropoietin therapy in sickle cell disease: Introduction and expression of the human β s-globin gene in cell anemia. **Sem. Oncol.**, v.19, p.74-81, 1992.

GORBUNOV, N. V. et al. Air blast-induced pulmonary oxidative stress: interplay among hemoglobin, antioxidants, and lipid peroxidation. **Am. J. Physiol.**, v. 272, n. 2, pt 1, p. L320-334, 1997.

GRACA-SOUZA, A. V. et al. Neutrophil activation by heme: implications for inflammatory processes. **Blood**, v. 99, n. 11, p. 4160-4165, 2002.

GROTE, K. et al. Toll-like receptors in angiogenesis. **Scient. World J.**, v. 11, p. 981-991, 2011.

HALLIWELL, B. Vitamin C: poison, prophylactic or panacea? **Trends Biochem. Sci.**, v. 24, n. 7, p. 255-259, 1999.

HEBBEL, R. P. Adhesion of sickle red cells to endothelium: myths and future directions. **Transfus. Clin. Biol.**, v. 15, n. 1-2, p. 14-18, 2008.

HEBBEL, R. P. et al. The endothelial biology of sickle cell disease: inflammation and a chronic vasculopathy. **Microcirculation**, v. 11, n. 2, p. 129-151, 2004.

HELLER, R. et al. L-Ascorbic acid potentiates nitric oxide synthesis in endothelial cells. **J. Biol. Chem.**, v. 274, n. 12, p. 8254-8260, 1999.

HERBERT, V. et al. Vitamin C-driven free radical generation from iron. **J. Nutr.** v. 126, n. 4 Suppl, p. 1213S-1220S, 1996.

HOLT, S.; MOORE, K. Pathogenesis of renal failure in rhabdomyolysis: the role of myoglobin **Exp. Nephrol.**, v. 8, n. 2, p. 72-76, 2000.

HOPPE, C. C. Inflammatory mediators of endothelial injury in sickle cell disease. **Hematol. Oncol. Clin. North. Am.**, v. 28, n. 2, p. 265-286, 2014.

HOPPE, C. et al. A pilot study of the short-term use of simvastatin in sickle cell disease: effects on markers of vascular dysfunction. **Br. J. Haematol.**, v. 153, n. 5, p. 655-663, 2011.

HORNIG, D. Distribution of ascorbic acid, metabolites and analogues in man and animals. **Ann. N Y Acad. Sci.**, v. 258, p. 103-118, 1975.

INGRAM, V. M. A specific chemical difference between the globins of normal human and sickle-cell anaemia haemoglobin. **Nature**, v. 178, n. 4537, p. 792-794, 1956.

JAIN, S. et al. Expression of regulatory platelet microRNAs in patients with sickle cell disease. **PLoS One**, v. 8, n. 4, p. e60932, 2013.

JENEY, V. et al. Pro-oxidant and cytotoxic effects of circulating heme. **Blood**, v. 100, n. 3, p. 879-887, 2002.

JOHNSON, C.; TELEN, M. J. Adhesion molecules and hydroxyurea in the pathophysiology of sickle cell disease. **Haematologica**, v. 93, n. 4, p. 481-485, 2008.

JONECKIS, C. C. et al. Integrin alpha 4 beta 1 and glycoprotein IV (CD36) are expressed on circulating reticulocytes in sickle cell anemia. **Blood**, v. 82, n. 12, p. 3548-3555, 1993.

KAELIN, W. G. Proline hydroxylation and gene expression. **Annu. Rev. Biochem.**, v. 74, p. 115-128, 2005.

KALINOWSKI, L. et al. Increased nitric oxide bioavailability in endothelial cells contributes to the pleiotropic effect of cerivastatin. **Circulation**, v. 105, n. 8, p. 933-938, 2002.

KATO, G. J. et al. Deconstructing sickle cell disease: reappraisal of the role of hemolysis in the development of clinical subphenotypes. **Blood Rev.**, v. 21, n. 1, p. 37-47, 2007.

KATO, G. J. et al. Vasculopathy in sickle cell disease: Biology, pathophysiology, genetics, translational medicine, and new research directions. **Am. J. Hematol.**, v. 84, n. 9, p. 618-625, 2009.

KIM, Y. W. et al. Inflammation and oxidative stress in angiogenesis and vascular disease. **J. Mol. Med.**, v. 91, n. 3, p. 323-328, 2013.

KOH, K. K. Effects of statins on vascular wall: vasomotor function, inflammation, and plaque stability. **Cardiovasc. Res.**, v. 47, n. 4, p. 648-657, 2000.

KOVACIC, P. Hydroxyurea (therapeutics and mechanism): metabolism, carbamoyl nitroso, nitroxyl, radicals, cell signaling and clinical applications. **Med. Hypotheses**, v. 76, n. 1, p. 24-31, 2011.

KUMAR, A. et al. Phorbol ester stimulation increases sickle erythrocyte adherence to endothelium: a novel pathway involving alpha 4 beta 1 integrin receptors on sickle reticulocytes and fibronectin. **Blood**, v. 88, n. 11, p. 4348-4358, 1996.

KUMAR, S.; BANDYOPADHYAY, U. Free heme toxicity and its detoxification systems in human. **Toxicol. Lett.**, v. 157, n. 3, p. 175-188, 2005.

KUREISHI, Y. et al. The HMG-CoA reductase inhibitor simvastatin activates the protein kinase Akt and promotes angiogenesis in normocholesterolemic animals. **Nat. Med.**, v. 6, n. 9, p. 1004-1010, 2000.

KUZKAYA, N. et al. Interactions of peroxynitrite, tetrahydrobiopterin, ascorbic acid, and thiols: implications for uncoupling endothelial nitric-oxide synthase. **J. Biol. Chem.**, v. 278, n. 25, p. 22546-22554, 2003.

- LANARO, C. et al. Altered levels of cytokines and inflammatory mediators in plasma and leukocytes of sickle cell anemia patients and effects of hydroxyurea therapy. **J. Leukoc. Biol.**, v. 85, n. 2, p. 235-242, p. 2009.
- LANDO, D. et al. Oxygen-dependent regulation of hypoxia-inducible factors by prolyl and asparaginyl hydroxylation. **Eur. J. Biochem.**, v. 270, n. 5, p. 781-790, 2003.
- LEE, P. J. et al. Hypoxia-inducible factor-1 mediates transcriptional activation of the heme oxygenase-1 gene in response to hypoxia. **J. Biol. Chem.**, v. 272, n. 9, p. 5375-5381, 1997.
- LETARTE, P. B. et al. Hemin: levels in experimental subarachnoid hematoma and effects on dissociated vascular smooth-muscle cells. **J. Neurosurg.**, v. 79, n. 2, p. 252-255, 1993.
- LINSTER, C. L.; VAN SCHAFTINGEN, E. Vitamin C. Biosynthesis, recycling and degradation in mammals. **FEBS J.**, v. 274, n. 1, p. 1-22, 2007.
- LOK, C. N.; PONKA, P. Identification of a hypoxia response element in the transferrin receptor gene. **J. Biol. Chem.**, v. 274, n. 34, p. 24147-24152, 1999.
- LOPES, F. C. et al. In vitro and in vivo anti-angiogenic effects of hydroxyurea. **Microvasc. Res.**, v. 94, p. 106-113, 2014.
- MALUF, S. et al. Length of treatment and dose as determinants of mutagenicity in sickle cell disease patients treated with hydroxyurea. **Environ. Toxicol. Pharmacol.**, v. 27, n. 1, p. 26-29, 2009.
- MAUGERI, N. et al. Inhibition of tissue factor expression by hydroxyurea in polymorphonuclear leukocytes from patients with myeloproliferative disorders: a new effect for an old drug? **J. Thromb. Haemost.**, v. 4, n. 12, p. 2593-2598, 2006.
- MAZZOLAI, L. et al. Tissue factor activity is upregulated in human endothelial cells exposed to oscillatory shear stress. **Thromb. Haemost.**, v. 87, n. 6, p. 1062-1068, 2002.
- MONTECINOS, V. et al. Vitamin C is an essential antioxidant that enhances survival of oxidatively stressed human vascular endothelial cells in the presence of a vast molar excess of glutathione. **J. Biol. Chem.**, v. 282, n. 21, p. 15506-15515, 2007.
- MONTEIRO, A. P. et al. Leukotriene B4 mediates neutrophil migration induced by heme. **J. Immunol.**, v. 186, n. 11, p. 6562-6567, 2011.

MOORE, K. P. et al. A causative role for redox cycling of myoglobin and its inhibition by alkalization in the pathogenesis and treatment of rhabdomyolysis-induced renal failure. **J. Biol. Chem.**, v. 273, n. 48, p. 31731-31737, 1998.

MULLER-EBERHARD, U.; FRAIG, M. Bioactivity of heme and its containment. **Am. J. Hematol.**, v. 42, n. 1, p. 59-62, 1998.

MULLER-EBERHARD, U. et al. Plasma concentrations of hemopexin, haptoglobin and heme in patients with various hemolytic diseases **Blood.**, v. 32, n. 5, p. 811-815, 1968.

NAOUM, P. C. Interferentes eritrocitários e ambientais na anemia falciforme **Rev. bras. hematol. hemoter.**, v. 22, n. 1, p. 05-22, 2000.

NEBOR, D. et al. Alpha-thalassemia is associated with a decreased occurrence and a delayed age-at-onset of albuminuria in sickle cell anemia patients. **Blood Cells. Mol. Dis.**, v. 45, n. 2, p. 154-158, 2010

NIETERT, P. J. et al. Sickle cell anaemia: epidemiology and cost of illness. **Pharmacoeconomics**, v. 20, n. 6, p. 357-366, 2002.

NUR, E. et al. Oxidative stress in sickle cell disease; pathophysiology and potential implications for disease management. **Am. J. Hematol.**, v. 86, n. 6, p. 484-489, 2011.

NUR, E. et al. Plasma levels of advanced glycation end products are associated with haemolysis-related organ complications in sickle cell patients. **Br. J. Haematol.**, v. 151, n. 1, p. 62-69, 2010.

ODIEVRE, M. H. et al. Pathophysiological insights in sickle cell disease. **Indian J. Med. Res.**, v. 134, p. 532-537, 2011.

ODIEVRE, M. H. et al. Modulation of erythroid adhesion receptor expression by hydroxyurea in children with sickle cell disease. **Haematologica**, v. 93, n. 4, p. 502-510, 2008.

PACELLI, R. et al. Hydroxyurea reacts with heme proteins to generate nitric oxide. **Lancet**, v. 347, n. 9005, p. 900, 1996.

PAKBAZ, Z.; WUN, T. Role of the hemostatic system on sickle cell disease pathophysiology and potential therapeutics. **Hematol. Oncol. Clin. North. Am.**, v. 28, n. 2, p. 355-374, 2014.

PALMER, R. M. et al. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. **Nature**, v. 333, n. 6174, p. 664-666, 1988.

PAULING, L. et al. Sickle cell anemia, a molecular disease. **Science**, v. 109, n. 2835, p. 443, 1949.

PLATT, O. S. et al. Pain in sickle cell disease. Rates and risk factors. **N. Engl. J. Med.**, v. 325, n. 1, p. 11-16, 1991.

PLATT, O. S. et al. Mortality in sickle cell disease. Life expectancy and risk factors for early death. **N. Engl. J. Med.**, v. 330, n. 23, p. 1639-1644, 1994.

PLATT, O.S. et al. Mortality in sickle cell disease. life expectancy and risk factors for early death. **N. Engl. J. Med.**, v.330, p.1639–1644, 1994.

POHL, U.; LAMONTAGNE, D. Impaired tissue perfusion after inhibition of endothelium-derived nitric oxide. **Basic. Res. Cardiol.**, v. 86, n. Suppl 2, p. 97-105, 1991.

POILLON, W. N. et al. Sparing effect of hemoglobin F and hemoglobin A2 on the polymerization of hemoglobin S at physiologic ligand saturations. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 90, n. 11, p. 5039-5043, 1993.

PRZYBYSZEWSKI, W. M.; KASPERCZYK, J. Radical mechanism of hydroxyurea side toxicity. **Postepy. Hig. Med. Dosw.**, (Online) n. 60, p. 516-526, 2006.

RAHIMI, Z. et al. Beta-globin gene cluster haplotypes in sickle cell patients from southwest Iran. **Am. J. Hematol.**, v. 74, n. 3, p. 156-160, 2003.

RAMALHO, A.S. As hemoglobinopatias hereditárias: um problema de saúde pública no Brasil. **Soc. Bras. Genet.**, n. 1, p. 160, 1986.

RAMALHO, V. C.; JORGE, N. Antioxidantes Utilizados Em Óleos, Gorduras E Alimentos Gordurosos **Quim. Nova**, v. 29, n. 4, p. 755-760, 2006

REES, D. C.; GIBSON, J. S. Biomarkers in sickle cell disease. **Br. J. Haematol.**, v. 156, n. 4, p. 433-445, 2012.

REITER, C. D. et al. Cell-free hemoglobin limits nitric oxide bioavailability in sickle-cell disease. **Nat. Med.**, v. 8, n. 12, p. 1383-1389, 2002.

RETSKY, K. L. et al. Ascorbic acid oxidation product(s) protect human low density lipoprotein against atherogenic modification. Anti- rather than prooxidant activity of vitamin C in the presence of transition metal ions. **J. Biol. Chem.**, v. 268, n. 2, p. 1304-1309, 1993.

ROGERS, Z. R. Hydroxyurea therapy for diverse pediatric populations with sickle cell disease. **Semin. Hematol.**, v.34, p.42–47, 1997.

RORY, C. et al. Heart Protection Study Collaborative Group "MRC/BHF Heart Protection Study of cholesterol lowering with simvastatin in 20,536 high-risk individuals: a randomised placebo-controlled trial. **Lancet**, v. 360, n. 9326, p. 7-22, 2002.

ROSCH, J. W. et al. Statins protect against fulminant pneumococcal infection and cytolysin toxicity in a mouse model of sickle cell disease. **J. Clin. Invest.**, v. 120, n. 2, p. 627-635, 2010.

RUMSEY, S. C. et al. Glucose transporter isoforms GLUT1 and GLUT3 transport dehydroascorbic acid. **J. Biol. Chem.**, v. 272, n. 30, p. 18982-18989, 1997.

RUPON, J. W. et al. The reactions of myoglobin, normal adult hemoglobin, sickle cell hemoglobin and hemin with hydroxyurea. **Biophys. Chem.**, v. 84, n. 1, p. 1-11, 2000.

SAFAYA, S. et al. Monocytes from sickle cell disease patients induce differential pulmonary endothelial gene expression via activation of NF-kappaB signaling pathway. **Mol. Immunol.**, v. 50, n. 1-2, p. 117-123, 2012.

SCHOFIELD, C. J.; RATCLIFFE, P. J. Oxygen sensing by HIF hydroxylases. **Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.**, v. 5, n. 5, p. 343-354, 2004.

SEMENZA, G. L. Hypoxia-inducible factor 1: master regulator of O₂ homeostasis. **Curr. Opin. Genet. Dev.**, v. 8, n. 5, p. 588-594, 1998.

SETTY, B. N. et al. Heme induces endothelial tissue factor expression: potential role in hemostatic activation in patients with hemolytic anemia. **J. Thromb. Haemost.**, v. 6, n. 12, p. 2202-2209, 2008.

SHAKLAI, N. et al. Accumulation and drainage of hemin in the red cell membrane. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 821, n. 2, p. 355-366, 1985.

SHIVA, S. et al. Ceruloplasmin is a NO oxidase and nitrite synthase that determines endocrine NO homeostasis. **Nat. Chem. Biol.**, v. 2, n. 9, p. 486-493, 2006.

SILVA, M. C. e SHIMAUTI, E. L. T. Eficácia e toxicidade da hidroxiuréia em crianças com anemia falciforme (Effectiveness and toxicity of hydroxyurea in children with sickle cell anemia) **Rev. bras. hematol. hemoter.**, v. 28, n. 2, p. 144-148, 2006.

SILVA, W. S. et al. Avaliação da cobertura do programa de triagem neonatal de hemoglobinopatias em populações do Recôncavo Baiano, Brasil. **Cad. Saúde Públ.**, v. 22, p. 2561-2566, 2006.

SIRTORI, C. R. The pharmacology of statins. **Pharmacol. Res.**, v. 88, p. 3-11, 2014.

SOLOVEY, A. et al. Endothelial cell expression of tissue factor in sickle mice is augmented by hypoxia/reoxygenation and inhibited by lovastatin. **Blood**, v. 104, n. 3, p. 840-846, 2004.

SOM, S. et al. Ascorbic acid: a scavenger of superoxide radical. **Acta Vitaminol. Enzymol.**, v. 5, n. 4, p. 243-250, 1983.

SONATI, M. F. e COSTA F. F. The genetics of blood disorders: hereditary hemoglobinopathies Genética das doenças hematológicas: as hemoglobinopatias hereditárias **J. Pediatr.**, v. 84, 2008.

STEINBERG, M. H. Management of sickle cell disease. **N. Engl. J. Med.**, v. 340, n. 13, p. 1021-1030, 1999.

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

STUART, M. J.; NAGEL, R. L. Sickle-cell disease. **Lancet**, v. 364, n. 9442, p. 1343-1360, 2004.

STYLES, L. A. et al. Decrease of very late activation antigen-4 and CD36 on reticulocytes in sickle cell patients treated with hydroxyurea. **Blood**, v. 89, n. 7, p. 2554-2559, 1997.

SUGIHARA, K. et al. Thrombospondin mediates adherence of CD36+ sickle reticulocytes to endothelial cells. **Blood**, v. 80, n. 10, p. 2634-2642, 1992.

SWERLICK, R. A. et al. Alpha 4 beta 1-integrin expression on sickle reticulocytes: vascular cell adhesion molecule-1-dependent binding to endothelium. **Blood**, v. 82, n. 6, p. 1891-1899, 1993.

TACCHINI, L. et al. Transferrin receptor induction by hypoxia. HIF-1-mediated transcriptional activation and cell-specific post-transcriptional regulation. **J. Biol. Chem.**, v. 274, n. 34, p. 24142-24146, 1999.

TSUKAGUCHI, H. et al. A family of mammalian Na⁺-dependent L-ascorbic acid transporters. **Nature**, v. 399, n. 6731, p. 70-75, 1999.

TURHAN, A. et al. Primary role for adherent leukocytes in sickle cell vascular occlusion: a new paradigm. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v. 99, n. 5, p. 3047-3051, 2002.

VEILLARD, N. R.; MACH, F. Statins: the new aspirin? **Cell. Mol. Life Sci.**, v. 59, n. 11, p. 1771-1786, 2002.

VERA, J. C. et al. Mammalian facilitative hexose transporters mediate the transport of dehydroascorbic acid. **Nature**, v. 364, n. 6432, p. 79-82, 1993.

VERA, J. C. et al. Human HL-60 myeloid leukemia cells transport dehydroascorbic acid via the glucose transporters and accumulate reduced ascorbic acid. **Blood**, v. 84, n. 5, p. 1628-1634, 1994.

- VICHINSKY E. New therapies in sickle cell disease. **Lancet**, v. 360, p. 629-631, 2002.
- VILAS BOAS, W. et al. Citocinas e associação com eventos clínicos na anemia falciforme cytokines and clinical events in the sickle cell anemia. **Gaz. Méd. Bahia**, v. 80, n. 3, p. 53-55, 2010.
- VISSERS, M. C. et al. Modulation of hypoxia-inducible factor-1 alpha in cultured primary cells by intracellular ascorbate. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 42, n. 6, p. 765-772, 2007.
- WAGENER, F. A. et al. Heme is a potent inducer of inflammation in mice and is counteracted by heme oxygenase. **Blood**, v. 98, n. 6, p. 1802-1811, 2001.
- WAGENER, F. A. et al. Heme induces the expression of adhesion molecules ICAM-1, VCAM-1, and E selectin in vascular endothelial cells. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.**, v. 216, n. 3, p. 456-463, 1997.
- WAGENER, F. A. et al. Heme-induced cell adhesion in the pathogenesis of sickle-cell disease and inflammation. **Trends Pharmacol. Sci.**, v. 22, n. 2, p. 52-54, 2001.
- WAKEFIELD, T. W. et al. Mechanisms of venous thrombosis and resolution. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, v. 28, n. 3, p. 387-391, 2008.
- WEBER, P. et al. Vitamin C and human health--a review of recent data relevant to human requirements. **Int. J. Vitam. Nutr. Res.**, v. 66, n. 1, p. 19-30, 1996.
- WELCH, R. W. et al. Accumulation of vitamin C (ascorbate) and its oxidized metabolite dehydroascorbic acid occurs by separate mechanisms. **J. Biol. Chem.**, v. 270, n. 21, p. 12584-12592, 1995.
- WENGER, R. H. Cellular adaptation to hypoxia: O₂-sensing protein hydroxylases, hypoxia-inducible transcription factors, and O₂-regulated gene expression. **FASEB J.**, v. 16, n. 10, p. 1151-1162, 2002.
- WEST, X. Z. et al. Oxidative stress induces angiogenesis by activating TLR2 with novel endogenous ligands. **Nature**, v. 467, n. 7318, p. 972-976, 2010.
- ZHANG, C. e F. ZHANG Iron homeostasis and tumorigenesis: molecular mechanisms and therapeutic opportunities. **Protein Cell.**, v. 6, n. 2, p. 88-100, 2015.
- ZHU, X. Y. et al. Disparate effects of simvastatin on angiogenesis during hypoxia and inflammation. **Life Sci.**, v. 83, n. 23-24, p. 801-809, 2008.