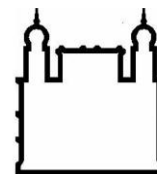




UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA  
FACULDADE DE MEDICINA  
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ



**Curso de Pós-Graduação em Patologia Humana e Experimental**

**TESE DE DOUTORADO**

**HIDROXIUREIA NA DOENÇA FALCIFORME: INFLUÊNCIA DE  
POLIMORFISMOS NOS GENES *MPO* E *SERPINA1* E IMPLICAÇÕES  
NAS VIAS DOS RECEPTORES TIPO TOLL E DO INFLAMASSOMA**

**THASSILA NOGUEIRA PITANGA**

**Salvador – Bahia  
2015**

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

**Curso de Pós-Graduação em Patologia Humana e Experimental**

**HIDROXIUREIA NA DOENÇA FALCIFORME: INFLUÊNCIA DE  
POLIMORFISMOS NOS GENES *MPO* E *SERPINA1* E IMPLICAÇÕES  
NAS VIAS DOS RECEPTORES TIPO TOLL E DO INFLAMASSOMA**

**THASSILA NOGUEIRA PITANGA**

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Marilda de Souza Gonçalves

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Patologia Humana e Experimental para obtenção do grau de Doutora.

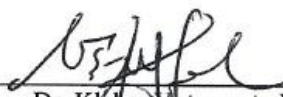
**Salvador – Bahia  
2015**

Título da Tese: "HIDROXIUREIA NA DOENÇA FALCIFORME: INFLUÊNCIA DE POLIFORMISMOS NOS GENES MPO E SERPINA1 E IMPLICAÇÕES NAS VIAS DOS RECEPTORES TIPO TOLL E DO INFLAMASSOMA".

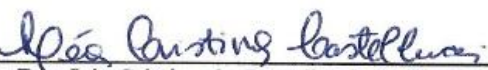
THASSILA NOGUEIRA PITANGA

FOLHA DE APROVAÇÃO

COMISSÃO EXAMINADORA



Dr. Kléber Yotsumoto Fertrin  
Professor Doutor  
UNICAMP



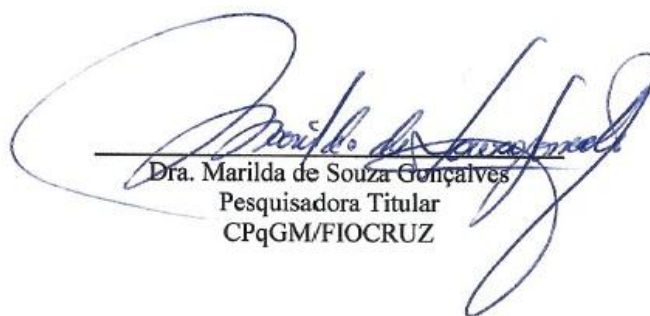
Dra. Léa Cristina de Carvalho Castellucci  
Pesquisadora  
UFBA



Dra. Paula Carvalho Lage V. Buettner Ristow  
Professora Adjunta  
UFBA



Dr. Marco Aurelio Salvino de Araujo  
Médico Hematologista  
UFBA



Dra. Marilda de Souza Gonçalves  
Pesquisadora Titular  
CPqGM/FIOCRUZ

Trabalho realizado no Laboratório de Hematologia, Genética e Biologia Computacional (LHGB) - Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz (CPqGM/Fiocruz-Ba), após aprovação dos projetos de pesquisa no Comitê de Ética em Pesquisa (CAAE 0022.0.225.000-09/CAAE: 04733612.7.0000.0040), com auxílio financeiro do CNPq, FAPESB, PPSUS/FAPESB e INCT do sangue.

“A adversidade tem o efeito de despertar talentos que em circunstâncias prósperas teriam continuado adormecidos”.

*Quintus Horatius Flaccus*

## AGRADECIMENTOS

Foi árduo chegar até aqui! Só eu sei quantas pedras encontrei no caminho. Mas também sei que este momento só foi possível porque tive pessoas maravilhosas que caminharam junto comigo, fazendo-me olhar sempre para frente, não me permitindo fraquejar.

Agradeço imensamente...

A **Deus**.....meu amigo, meu pai, meu mentor! Ao senhor devo absolutamente tudo! *Laus deo*.

Aos meus pais, Abílio César e Martha Pitanga, pelos melhores ensinamentos que uma pessoa pode receber, e por nunca me permitirem esquecer o lado mais rico da vida: a humildade. Sempre agradecerei a vocês por terem me ensinado a ser tudo o que sou. Amo vocês!

Aos meus irmãos, Patrícia, Viviane e Neto pela amizade, amor e cuidado!

À minha linda família, pelo amor e carinho eternos. Minha eterna gratidão à pessoa mais linda do mundo: minha avó Lourdes! Obrigada por todas aquelas noites de muitas leituras. Com a senhora aprendi não só o gosto pela leitura, mas a ser questionadora, estudiosa, o que resultou nesta neta aqui que sempre quer aprender mais e mais. Amo-te infinitamente, vó!

A Tio Luiz Almeida (*in memoriam*), tia Lúcia Cortizo e família. Obrigada pelo carinho, cuidado e por acreditarem tanto em mim. Amo muito vocês!

À minha encantadora e maravilhosa orientadora, Dra. Marilda Gonçalves. Falei várias vezes, e repito quantas vezes for preciso. Esse amor que sinto vai além da relação aluno-professor. É amor de filha! Te amo, pró! Obrigada por acreditar tanto em mim. Obrigada por realizar meu sonho! OBRIGADA!

A Ricardo Riccio, não apenas pelas grandes contribuições científicas e intelectuais, mas por ter colocado toda a sua energia nesse último ano do meu doutorado a fim de que eu continuasse acreditando que seria possível chegar até aqui. Teria sido muito difícil sem o seu apoio! Eternamente grata a você!

À minha querida Dra. Valéria Borges, pelo eterno carinho e amizade, e pelas discussões científicas sempre enriquecedoras.

À Dra. Tânia Barros, a pessoa que me iniciou na pesquisa, lá em 2005, e a quem sempre serei eternamente grata por isso.

Aos amigos queridos, Carolzinha, Ray, Sânzio e Dalila! Definitivamente, sem vocês eu não teria conseguido. Valeu por todas as madrugadas de experimentos e discussões sobre cada resultado. Obrigada pela parceria, meus amigos!

A todos do LPBM, LHGB e LPA, em especial, Dr. Luiz Alcântara, Dr. Vitor Maffili, Dra. Márcia Weber, Dra. Magda Seixas, Dra. Cyntia, Ms. Júnia, Ms. Milena, Camila, Luciana e Corynne. O apoio de vocês foi muito importante.

Aos meus grandes amigos, os irmãos que escolhi, o meu mais puro e verdadeiro amor de irmã...vocês sabem quem são!!!

Aos meus queridos parceiros, Wendell Vilas Boas, Bruno Cerqueira e Filipe Rego. Obrigada por todos os ensinamentos, brincadeiras, discussões sobre o trabalho (e sobre a vida) e, acima de tudo, pela amizade. Sinto uma saudade imensa do nosso maravilhoso convívio! Amo vocês, meus amigos.

A Dr. Ronald Blanton e família, bem como à sua equipe (Lúcio, Walter, Peace, João, Rafael e Sandya), por terem me acolhido tão bem no laboratório, em Cleveland-Ohio! Obrigada pelos ensinamentos!

A Lúcio Barbosa, e à sua linda família que tanto amo, pela eterna amizade e parceria! Agradecerei eternamente por ter me mostrado esse mundo da pesquisa sem fronteiras, e por todos os dias você ter tentado me ensinar a “sorrir, respirar e ir devagar”. Ainda estou aprendendo!

Aos meus grandes e eternos parceiros da B05! Em especial: Viviane, Luciana, Felipe, Thayna e Rodrigo! Como sinto falta da convivência com vocês!

Aos amigos Kiyoshi Fukutani, Everton Batista, Tiago Landim, Antônio Muniz, Jessica Petrilli, Silvana Paz e Liliane Cunha por estarem sempre dispostos a me ajudar.

Aos parceiros Sérgio, Jane, Elze, Rita e Jurema, pela ajuda, amizade e ótimas conversas durante todo o doutorado. O que vocês fizeram por mim vai muito

além da simples ajuda na esterilização dos materiais ou questões burocráticas da secretaria e administração. Obrigada!

Aos colegas de trabalho do ICS/UFBA, pela torcida e apoio. Obrigada pelo carinho!

A todos os meus alunos que torceram muito por esse momento. Vocês foram a força motriz para a realização desse sonho! Espero um dia poder retribuir todo esse carinho.

À Faculdade de Farmácia/UFBA, à HEMOBA, aos técnicos de enfermagem e à Dra. Valma Lopes, a qual me permitiu trabalhar com os pacientes.

A toda equipe da biblioteca, local onde passei boa parte do meu tempo pesquisando e desenvolvendo essa tese.

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

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

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior do Ministério da Educação – CAPES, e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq, pelo apoio financeiro.

*E, por fim, meu eterno agradecimento aos **pacientes** e voluntários que confiaram em mim e participaram desse estudo, permitindo, portanto, a realização de cada experimento.*

**Que meus resultados venham para melhorar a vida de vocês, os verdadeiros merecedores de todas as honras desse trabalho.**

*Muito obrigada!*



PITANGA, Thassila Nogueira. Hidroxiureia na doença falciforme: influência de polimorfismos nos genes *MPO* e *SERPINA1* e implicações nas vias dos receptores tipo Toll e do Inflamassoma 157 f. il. Tese (Doutorado) – Fundação Oswaldo Cruz, Instituto de Pesquisas Gonçalo Moniz, Salvador, 2015.

## RESUMO

**Introdução:** A doença falciforme (DF) é uma condição inflamatória associada a crises vaso-oclusivas e hemólise intravascular. Os polimorfismos nos genes *SERPINA1* e mieloperoxidase (*MPO*) -463G>A estão associados a complicações vasculares na DF. Pacientes com DF são tratados com hidroxiureia (HU), que aumenta os níveis de hemoglobina fetal (HbF) e diminui a contagem de leucócitos. Os receptores do tipo Toll (TLR) desempenham papel importante na manutenção do estado inflamatório observado nestes pacientes e o inflamassoma associado à proteína 3 do receptor tipo NOD (NLRP3) poderia contribuir para essa inflamação, uma vez que o conteúdo eritróide atua como sinais de perigo (eDAMPs) para ativar esta via. **Objetivos:** O objetivo geral desse trabalho foi avaliar a possível interferência de polimorfismos nos genes da *MPO* e *SERPINA1* em pacientes com DF na resposta ao tratamento com HU e investigar se esse tratamento pode interferir na expressão gênica de TLR e NOD induzida por hemácias dos pacientes com anemia falciforme (AF). Os objetivos específicos foram avaliar a associação entre esses polimorfismos e aspectos clínicos e laboratoriais em resposta ao tratamento com HU; a expressão de TLR2, TLR4, TLR5 e TLR9 em células mononucleares do sangue periférico (PBMC) de pacientes com AF e o papel que os eritrócitos desempenham na indução da expressão dos TLR, e o efeito *in vitro* da HU; investigar a expressão de NLRP3, caspase-1, interleucina (IL)-1 $\beta$  e IL-18 em PBMC de pacientes com AF e o papel que os eritrócitos exercem na expressão dessas moléculas, além do efeito *in vitro* da HU. **Métodos:** Foram analisadas amostras de sangue de 356 pacientes com DF e 100 voluntários saudáveis. Sessenta e nove pacientes foram rastreados para o polimorfismo -463G>A *MPO* e 129 para *SERPINA1* por métodos baseados em PCR e enzimas de restrição. PBMC e hemácias de pacientes com AF (SS-RBC) e voluntários saudáveis (AA-RBC) foram obtidos. PBMCs foram estimulados com SS- ou AA-RBC na presença de HU. Expressões gênicas de TLRs e NOD foram avaliadas por qPCR. As produções de leucotrieno-B<sub>4</sub> (LTB<sub>4</sub>), IL-1 $\beta$  e proteína ligadora (BP) de IL-18 foram determinadas por ELISA, e a produção de nitrito foi medida pela reação de Griess. **Resultados:** Entre os pacientes com DF em uso de HU, aqueles com o polimorfismo para *MPO* apresentaram níveis aumentados de ferritina e de HbF, ao passo que estes parâmetros não estiveram alterados em pacientes tratados e sem o polimorfismo. Em contraste, pacientes com DF com polimorfismo *SERPINA1* apresentaram aumento dos níveis de ferritina e diminuição dos níveis de alfa-1 antitripsina (AAT). O tratamento com HU coincidiu com níveis elevados de ferritina em ambos os grupos, ao passo que os níveis de AAT foram reduzidos apenas no grupo mutante. Os pacientes tratados com HU sem polimorfismo *SERPINA1* apresentaram redução na contagem de leucócitos e nos níveis de AAT. TLR2, TLR4 e TLR5 estiveram altamente expressos em PBMC de pacientes com AF, em comparação com voluntários saudáveis, enquanto a expressão de TLR9 foi similar em ambos os grupos. Além disso, hemácias intactas de pacientes com AF ou submetidas à lise (SS-RBC), mas não dos voluntários sadios (AA-RBC), induziram a expressão de TLR9, e tanto as AA- quanto SS-RBC lisadas induziram a expressão de TLR2, TLR4

e TLR5. Curiosamente, o tratamento com HU aumentou a expressão de TLR2 e não interferiu na expressão de outros TLRs. Embora SS-RBC induza produção de LTB<sub>4</sub> e de nitrito, a HU não impede secreção de LTB<sub>4</sub>, mas reduz a produção de nitrito. NLRP3 e IL-1 $\beta$  são altamente expressos em PBMC de pacientes com AF quando em comparação com voluntários saudáveis. Adicionalmente, mostramos que SS-RBC intactas ou submetidas à lise, mas não AA-RBC, induziram a expressão de caspase-1 e IL-18, e AA-RBC lisadas induziram a expressão de NLRP3 e IL-1 $\beta$ . Os SS-RBCs íntegros, mas não AA-RBCs, induziram a produção de IL-1 $\beta$ . O tratamento com HU não interferiu na expressão de proteínas do inflamassoma associado ao NLRP-3, ao passo que induziu a produção de IL-18BP. **Conclusão:** Estes resultados em conjunto indicam que as alterações genéticas, tais como polimorfismos em genes de *MPO* e *SERPINA1*, interferem na resposta ao tratamento com HU. Também ficou evidente que hemácias, especialmente SS-RBC, agem como eDAMPs, estimulando a expressão de TLR e NOD, contribuindo para a inflamação. O uso de HU não impede a inflamação dependente de TLR e da plataforma do inflamassoma associada ao NLRP3. Estes conhecimentos podem levar ao desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas que atuem em vias diferentes daquelas observadas para HU.

**Palavras-chave:** Anemia falciforme; hidroxiureia; polimorfismo de mieloperoxidase; gene *SERPINA1*; inflamação via Toll; inflamassoma

PITANGA, Thassila Nogueira. Hydroxyurea in sickle cell disease: influence of *MPO* and *SERPINA1* gene polymorphisms and implications in Toll-like receptors and Inflammasome. 157 f. il. Tese (Doutorado) – Fundação Oswaldo Cruz, Instituto de Pesquisas Gonçalo Moniz, Salvador, 2015.

## ABSTRACT

**Introduction:** Sickle cell disease (SCD) is an inflammatory condition associated with vaso-occlusive and painful episodes intravascular hemolysis. *SERPINA1* and *myeloperoxidase (MPO)-463G>A* gene polymorphisms are associated with vascular complications in sickle cell disease (SCD). SCD patients are treated with Hydroxyurea (HU), which increases levels of fetal hemoglobin (HbF) and decreases leukocytes. Toll-like receptors (TLR) play important role in the maintenance of the inflammatory status observed in these patients and the nod-like receptor protein 3 (NLRP3)-inflammasome platform could contribute this inflammation, since erythroid contents acts as danger signals (eDAMPs) for activating this pathway. **Objectives:** The aim of this study was to evaluate the possible influence of *MPO* and *SERPINA1* genes polymorphisms in SCD patients in response to HU treatment and investigate whether this treatment can interfere with gene expression of TLR and NOD-induced red cells of patients with sickle cell anemia (SCA). The specific objectives were to evaluate the association between these polymorphisms and clinical and laboratory aspects in response to HU treatment; to evaluate the expression of TLR2, TLR4, TLR5 and TLR9 in peripheral blood mononuclear cells (PBMC) of SCA patients and the role that erythrocytes plays in the expression of these TLRs, and in vitro effect of Hydroxyurea; to investigate the expression of NLRP3, Caspase-1, interleukin (IL)-1 $\beta$  and IL-18 in PBMC of SCA patients and the role that erythrocytes plays in the expression of these molecules, and in vitro effect of Hydroxyurea. **Methods:** Blood samples from 356 SCD patients and 100 healthy volunteers were analyzed. Sixty-nine patients were screened for *-463G>A MPO* and 129 for *SERPINA1* polymorphisms by RT-PCR-based methods. PBMC and red blood cells of SCA patients (SS-RBC) and healthy volunteers (AA-RBC) were obtained. PBMC were challenged with SS- or AA-RBC in presence of hydroxyurea (HU). TLRs and NODs gene expressions were performed by qPCR. Leukotriene-B<sub>4</sub> (LTB<sub>4</sub>), IL-1 $\beta$  and IL-18 bind protein (BP) production were performed by Elisa. Nitrite production was measured by Griess reaction. **Results:** In the general SCD patients, independent of gene polymorphisms, HU-treated individuals exhibit increased levels of serum ferritin and HbF and reduction of leukocytes count. The *MPO* polymorphism was associated with reduction in platelet and leukocytes counts. Under HU treatment, patients with *MPO* polymorphism showed increased levels of ferritin and HbF, whereas these parameters were not changed after treatment of patients without polymorphism. In contrast, SCD patients with *SERPINA1* polymorphism presented increased levels of ferritin and decreased levels of Alpha-1 antitrypsin (AAT). HU treatment significantly increased ferritin levels in both groups, whereas AAT were reduced only in the mutant group. HU-treated patients without *SERPINA1* polymorphism exhibit reduction in total leukocytes count and AAT levels. TLR2, TLR4 and TLR5 are highly expressed in PBMC of SCA patients, comparing to healthy volunteers, whereas TLR9 expression was similar in both groups. Additionally, intact or lysed SS-RBC, but not AA-RBC, induces TLR9 expression, and lysed, both AA- and SS-RBC, induces expression of TLR2, TLR4 and TLR5. Interestingly, HU treatment increases expression of TLR2 and does not interfere with expression of other TLRs. Moreover,

although SS-RBC induces LTB<sub>4</sub> and Nitrite, production, HU does not prevent LTB<sub>4</sub> but reduces nitrite production. NLRP3 and IL-1 $\beta$  are highly expressed in PBMC of SCA patients when compared to healthy volunteers. In addition, we showed that intact or lysed SS-RBC, but not AA-RBC, induces Caspase-1 and IL-18 expression, and lysed AA-RBC induces expression of NLRP3 and IL-1 $\beta$ . Moreover, Intact SS-RBC, but not AA-RBC, induces production of IL-1 $\beta$ . Treatment with hydroxyurea (HU) showed no interference with the expression of NLRP-3-inflammasome proteins, whereas induced production of IL-18BP. **Conclusion:** These results together point out that genetic change, such as mutations in MPO and SERPINA1 genes, interfere with the response to HU treatment. In addition, there are more evidence that RBCs, especially SS-RBCs, act as eDAMPs, stimulating TLR and NOD expression and contributing to inflammation. This study highlighted that HU does not prevent TLR- and NLRP3-inflammasome-dependent inflammation. This knowledge could lead to the development of new therapeutic strategies, which act in different ways from those given by hydroxyurea.

**Keywords:** Sickle cell anemia; hydroxyurea; *myeloperoxidase* gene polymorphism; *SERPINA1* gene polymorphism; toll-dependent inflammation; inflammasome

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1.</b> A mutação de ponto e a origem da hemoglobina S. ....	20
<b>Figura 2.</b> Distribuição global do alelo $\beta^S$ . ....	22
<b>Figura 3.</b> Eventos fisiopatológicos presentes no desenvolvimento das crises vaso-occlusivas na doença falciforme. ....	24
<b>Figura 4.</b> Representação das moléculas envolvidas na hemólise intravascular e bioatividade do NO na anemia falciforme. ....	25
<b>Figura 5.</b> Toll-like receptors (TLR) e seus ligantes (PAMPs e DAMPs).....	31
<b>Figura 6.</b> Ativação do inflamassoma do NLRP3.....	36

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA-PBMC	Células mononucleares de sangue periférico de voluntários sadios
AA-RBC	Eritrócitos de voluntários sadios
AAT	Alfa 1 antitripsina
AF	Anemia falciforme
ALT	Alanina aminotransferase
AST	Aspartato aminotransferase
ASC	Proteína associada a apoptose (do ingles <i>Apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD</i> )
AVC	Acidente vascular cerebral
DAMPs	Padrões moleculares associados a danos (do inglês <i>Damage-associated molecular pattern molecules</i> )
DF	Doença falciforme
eDAMP	Padrões moleculares associados a danos de eritrócitos
GAPDH	<i>Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase</i>
GTP	Guanosina trifosfato
HbF	Hemoglobina fetal
HbS	Hemoglobina S
HMGB1	Proteína box-1 do grupo de alta mobilidade (do inglês <i>high-mobility group box 1</i> )
HU	Hidroxiureia
IL	Interleucina
IL-18BP	Proteína ligadora de IL-18 (do Inglês <i>IL-18 bind protein</i> )
LDH	Lactato desidrogenase
MPO	Mieloperoxidase
NLR	Receptor do tipo NOD
NLRP3	<i>NLR family, pyrin domain containing 3</i>
NO	Óxido nítrico
NOD	Domínio de oligomerização nuclear (do inglês <i>nucleotide oligomerization domain</i> )
NOS	Óxido nítrico sintase (do inglês <i>nitric oxide sintase</i> )
PAMPs	Padrões moleculares associados a patógenos (do inglês <i>pathogen-associated molecular patterns</i> )

PBMC	Células mononucleares de sangue periférico (do inglês <i>peripheral blood mononuclear cell</i> )
PBS	Salina tamponada com fosfato
PCR	Proteína C reativa
PRR	Receptores de reconhecimento padrão (do inglês <i>pattern recognition receptors</i> )
qPCR	Reação em cadeia da polimerase em tempo real (do inglês <i>polymerase chain reaction in real time</i> )
RNS	Espécies reativas de nitrogênio (do inglês <i>reactive nitrogen species</i> )
ROS	Espécies reativas de oxigênio (do inglês <i>reactive oxygen species</i> )
RT-PCR	Reação em cadeia da polimerase via transcriptase reversa
SCA	Anemia Falciforme (do inglês <i>sickle cell anemia</i> )
SCD	Doença Falciforme (do inglês <i>sickle cell disease</i> )
SS-PBMC	Células mononucleares de sangue periférico de indivíduos com anemia falciforme
SS-RBC	Eritrócitos de indivíduos com anemia falciforme
TLR	Receptor do tipo Toll

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO .....	16
2	REVISÃO DE LITERATURA .....	20
2.1	Doença Falciforme: Considerações Gerais e Epidemiologia .....	20
2.2	Manifestações Clínicas e Fisiopatologia .....	23
2.3	Hemólise e Óxido Nítrico .....	24
2.4	Terapia Farmacológica na Doença Falciforme: Hidroxiureia .....	27
2.5	Polimorfismos nos Genes da Mieloperoxidase e dea Alfa-1 Antitripsina .....	28
2.6	Resposta Imune Inata .....	31
2.6.1	<i>Receptores do tipo toll (tlrs)</i> .....	31
2.6.2	<i>Receptores do tipo nod (nlrs) e o inflamassoma</i> .....	34
3	JUSTIFICATIVA.....	38
4	HIPÓTESES .....	40
5	OBJETIVOS .....	41
5.1	Objetivo Geral.....	41
5.2	Objetivos Específicos .....	41
6	MANUSCRITOS.....	43
6.1	Manuscrito 1 .....	43
6.2	Manuscrito 2 .....	70
6.3	Manuscrito 3 .....	98
7	DISCUSSÃO.. .....	124
8	CONCLUSÃO .....	132
	REFERÊNCIAS.....	133
	APÊNDICE A: Artigos produzidos durante o período de doutorado que não fizeram parte da tese .....	148
	APÊNDICE B: Termo de consentimento livre e esclarecido para pacientes e controles que participaram do manuscrito 1 .....	151
	APÊNDICE C: Termo de consentimento livre e esclarecido para pacientes e controles que participaram dos manuscritos 2 e 3.....	153
	APÊNDICE D: Questionário epidemiológico para pacientes e controles .....	155



## 1 INTRODUÇÃO

A doença falciforme (DF) é uma desordem genética caracterizada pela presença da hemoglobina S (HbS) e quadro inflamatório persistente. A HbS decorre de uma mutação de ponto no sexto códon do gene *beta* (*HBB*) da globina ( $GAG \rightarrow GTG$ ), com substituição do ácido glutâmico por valina, na cadeia polipeptídica beta. A DF é uma doença hereditária monogênica, cuja homozigose para o alelo beta S ( $\beta^S$ ) (HbSS) é denominada anemia falciforme (AF), a forma mais grave da doença. Entretanto, outros genótipos descritos para a DF são decorrentes da combinação da HbS com outras Hb variantes ou com alterações de síntese da globina ou talassemia. A HbS polimeriza em condições de hipóxia, modificando a forma dos eritrócitos, no fenômeno conhecido como falcização, que contribui para a ocorrência de hemólise precoce e infartos teciduais. O indivíduo heterozigoto para o alelo  $\beta^S$ , ou portador do genótipo HbAS, é assintomático (WEATHERALL e PROVAN, 2000; STEINBERG, 2008; TAYLOR et al., 2008).

As crises vaso-oclusivas são as causas mais frequentes de hospitalização e óbito nos indivíduos com DF. A hemólise e a liberação de moléculas associadas ao catabolismo da Hb tais como heme, Hb livre e ferro, criam um ambiente pró-oxidante, contribuindo para a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e nitrogênio (RNS), com ativação de leucócitos, plaquetas, eritrócitos, reticulócitos e células endoteliais vasculares, levando a redução na biodisponibilidade do óxido nítrico (NO), característica primária da disfunção endotelial. O aumento na expressão de moléculas de adesão nos eritrócitos falcizados e nos reticulócitos (principalmente CD36, CD71 e anexina V), bem como em leucócitos, plaquetas (CD61 e CD62) e endotélio vascular, favorece os fenômenos vaso-oclusivos, propiciando a ocorrência de crises de dor, que envolvem articulações, abdome ou órgãos diversos. O paciente com DF possui susceptibilidade exacerbada a infecções em decorrência da asplenia funcional, além do risco aumentado para alterações neurológicas, ósseas, pulmonares e renais, entre outras (EBERHARDT et al., 2003; COVAS et al., 2004; MORRIS et al., 2008; STEINBERG, 2008).

Em circunstâncias normais, a óxido nítrico sintase (NOS) produz níveis basais de NO, que são importantes na manutenção da homeostase vascular. Entretanto, este equilíbrio é alterado durante a hemólise intravascular ocorrida na DF, principalmente devido ao aumento de arginase e consumo de arginina, com

repercussão na biodisponibilidade de NO. As hemácias falcizadas ou não e os reticulócitos, bem como os seus produtos de lise, induzem a disfunção vascular crônica e aumentam os níveis sistêmicos de citocinas inflamatórias, mobilizando células mononucleares – as principais células da resposta imune inata- propiciando sua adesão ao endotélio vascular e contribuindo para os episódios vaso-oclusivos (SWITZER et al., 2006; CONRAN et al., 2007; WOOD, HSU e GLADWIN, 2008; ZENNADI et al., 2008).

Os produtos do metabolismo do NO, tais como nitrito e nitrato, encontram-se aumentados no ambiente inflamatório vascular presente na DF, implicando na redução da quantidade de NO bioativo. Isso contribui para a disfunção vascular e propagação da resposta inflamatória em uma reação de ativação em cascata de hemácias, plaquetas, células endoteliais e leucócitos. Estes últimos estão representados principalmente por monócitos e linfócitos, além de células imaturas, como as células linfoides (ILCs) e linfócitos *natural killer* (NKT), que participam ativamente da amplificação da resposta inflamatória na DF (ZENNADI et al., 2008; NATHAN et al., 2012).

Nesse contexto, a ativação contínua das células do sistema imune inato, principalmente monócitos e linfócitos, contribui para o aumento da secreção de citocinas proinflamatórias, como interleucina (IL)-1 $\beta$  e IL-18; ativação de enzimas pró-oxidantes e inflamatórias, tal como a mieloperoxidase (MPO); além da redução da atividade de enzimas anti-inflamatórias, como a alfa-1 antitripsina (AAT), reforçando seu papel na manutenção do quadro inflamatório na doença (CAJADO et al., 2011; CERQUEIRA et al., 2011; PITANGA et al., 2013).

A MPO é uma NO oxidase produzida, principalmente, por monócitos e neutrófilos ativados. Modula a resposta inflamatória vascular e contribui para a redução da biodisponibilidade do NO bioativo (EISERICH et al., 2002; GALIJASEVIC et al., 2006), e disfunção do endotélio vascular (ZHANG et al., 2013). Esta enzima e seus produtos de ativação estão aumentados em condições inflamatórias, como em pacientes com DF, principalmente durante os episódios de crise vaso-oclusiva ou quadros infecciosos, sugerindo que esta enzima pode contribuir diretamente para a resposta vascular e na proteção contra infecções (EISERICH et al., 2002; COSTA et al., 2005; REES, WILLIAMS e GLADWIN, 2010).

A enzima AAT é sintetizada predominantemente em hepatócitos e secretada no plasma, apresenta seus níveis séricos aumentados durante o processo inflamatório

ou lesão tecidual e está associada a inibição de proteases, especialmente a elastase, uma enzima proteolítica produzida por leucócitos e relacionada à patogênese da DF (RUDNICK e PERLMUTTER, 2005).

A resposta imune inata é a primeira linha de defesa contra patógenos, além de ser o principal responsável por manter a função homeostática dos tecidos, como durante o reparo tecidual após lesão estéril. As células do sistema imune inato devem ser capazes de diferenciar o próprio do não-próprio, o que inclui diferenciar microrganismos benéficos da microbiota normal de outros patogênicos (RICCIARDI-CASTAGNOLI e GRANUCCI, 2002).

O sistema imune inato, além de reconhecer padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs, *pathogen-associated molecular patterns*), reconhece padrões moleculares associados ao perigo (DAMPs, *damage-associated molecular pattern molecules*), os quais são proteínas citosólicas ou nucleares liberadas em diversas situações de “perigo”, como no caso do estresse celular constante observado em células endoteliais de pacientes com AF. A ativação do sistema imune inato, tanto a partir da presença de patógenos, como de origem não-infecciosa, é responsável por iniciar e manter a resposta inflamatória enquanto houver contato com o agente desencadeador (VANCE, ISBERG e PORTNOY, 2009; CERQUEIRA et al., 2011). Os PAMPs e DAMPs são reconhecidos por diversas células da linha de defesa inicial que expressam receptores de reconhecimento padrão (PRRs), como monócitos, macrófagos, células dendríticas, neutrófilos e células epiteliais. Os receptores do tipo Toll (TLRs) são PRRs presentes majoritariamente na superfície da célula (mas alguns tipos, como o TLR9, podem ser encontrados em endossomos), os quais reconhecem DAMPs e PAMPs associados a patógenos intra ou extracelular. Os receptores do tipo NOD (NLRs) auxiliam a resposta imune inata por meio do reconhecimento de PAMPs e DAMPs (VANCE, ISBERG e PORTNOY, 2009; SCHRODER e TSCHOPP, 2010; LATZ, XIAO e STUTZ, 2013).

O paciente com DF apresenta quadro inflamatório persistente, diretamente relacionado às complicações clínicas mais graves dessa doença, que vão desde acidente vascular cerebral (AVC) a hipertensão pulmonar e alterações cardiovasculares (GLADWIN et al., 2004; SCHNOG et al., 2004; WOOD, HEBBEL e GRANGER, 2004; KATO et al., 2009). Embora esse quadro inflamatório contribua decisivamente para o número de hospitalizações e óbitos nesses pacientes, até o presente momento, o único agente farmacológico mundialmente liberado para o

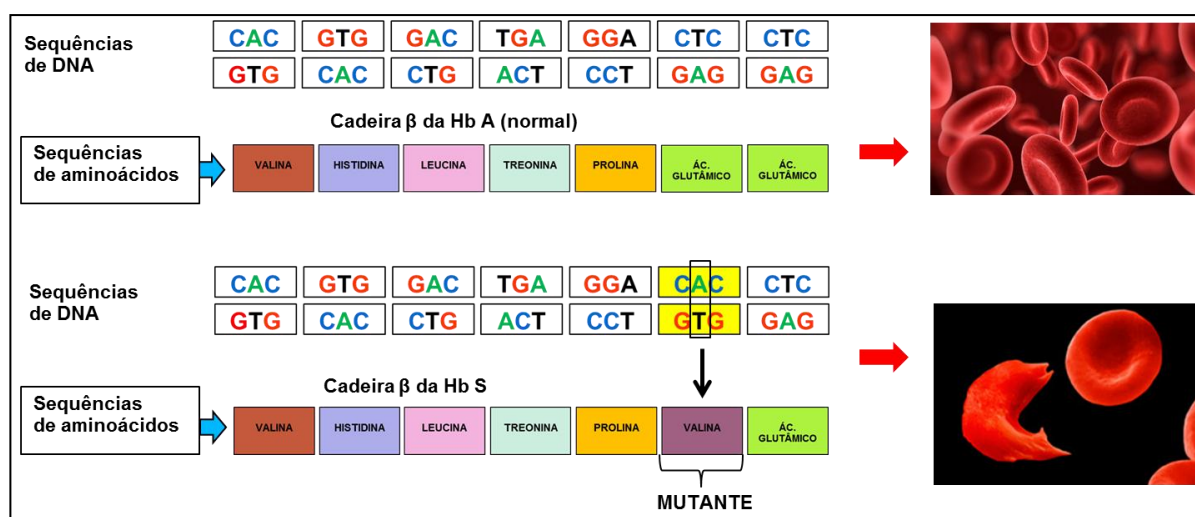
tratamento de pacientes graves com DF é o antineoplásico hidroxiureia (HU). Este fármaco está diretamente associado à melhora clínica do paciente, pois induz aumento nos níveis de Hb fetal (HbF), contribuindo para a redução na incidência de eventos vaso-oclusivos; está associado a redução na contagem de leucócitos e expressão de moléculas de adesão (PLATT, 2008). Entretanto, pouco se sabe a respeito da resposta ao tratamento com HU e sua ação nas vias da inflamação dependentes dos receptores tipo Toll e NOD, ou se a resposta ao tratamento sofre interferência na presença de polimorfismos genéticos em moléculas associadas a inflamação, como os descritos nos genes *MPO* e *SERPINA1*, uma vez que os pacientes respondem de maneira diferenciada à HU (GREEN e BARRAL, 2011; BARBOSA et al., 2014)

Dessa forma, na tentativa de melhor compreender os mecanismos associados a agentes que possam estar contribuindo para o quadro inflamatório recorrente dos pacientes com DF, torna-se essencial investigar a associação dos polimorfismos em genes responsáveis pela síntese de MPO e AAT nestes pacientes bem como suas associações com marcadores hematológicos e bioquímicos, e avaliar se estas alterações genéticas afetam a resposta ao tratamento com HU. Além disso, é de fundamental importância a compreensão dos mecanismos envolvidos na ativação da imunidade inata nesses pacientes, mediada por TLR e NOD, bem como a possível interferência na expressão destes receptores durante o tratamento com HU, uma vez que estes são relacionados às duas principais vias da inflamação. Portanto, a compreensão do papel desses polimorfismos e receptores da resposta imune inata frente a hemácias falcizadas, ou produtos da hemólise, na presença ou não de HU, contribuirá com informações relevantes que podem melhorar o tratamento dos pacientes com DF, uma condição patológica grave que acomete cerca de 7% da população mundial (WEATHERALL e CLEGG, 2001).

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Doença Falciforme: Considerações Gerais e Epidemiologia

O termo doença falciforme (DF) é usado para denominar um grupo de alterações genéticas com significância clínica, que apresentam a Hb S no seu perfil de hemoglobinas. Incluem-se ao grupo das DFs, as duplas heterozigoses, correspondendo às associações da Hb S com outras variantes, tais como as Hb C e Hb D, as interações com talassemias (Hb S/ $\beta^0$  talassemia, Hb S/ $\beta^+$  talassemia, Hb S/ $\alpha$  talassemia) e a anemia falciforme (AF) (BRASIL, 2001; STEINBERG e RODGERS, 2001; REES, WILLIAMS e GLADWIN, 2010).



**Figura 1. A mutação de ponto e a origem da hemoglobina S.**

A HbS é decorrente da substituição do aminoácido adenina por timina ( $GAG \rightarrow GTG$ ), resultando na da valina em substituição ao ácido glutâmico, na posição 6 da cadeia da globina beta da hemoglobina. Figura adaptada (FRENETTE e ATWEH, 2007).

A Hb S é decorrente da mutação de ponto com substituição da base nucleotídica adenina por timina ( $GAG \rightarrow GTG$ ), localizada no sexto códon do gene *beta* (*HBB*) da globina, codificando ácido glutâmico por valina na cadeia polipeptídica beta (Figura 1). A mutação em uma das globinas beta caracteriza o indivíduo como heterozigoto para a HbS (HbAS), que não apresenta manifestações clínicas da doença. A mutação nas duas globinas beta implica na forma mais grave da DF, a anemia falciforme, caracterizada pela homozigose do alelo beta S ( $\beta^S$ ), com

produção de HbSS (EMBURY, 1986; BRASIL, 2001; STEINBERG, 2008; ODIEVRE et al., 2011).

Em condições de hipóxia, ocorre a polimerização da HbS com formação de estruturas filamentosas ou poliméricas que se depositam no interior dos eritrócitos, modificando a sua forma bicôncava para o formato alongado, semelhante ao de foice ou meia lua. A falcização dos eritrócitos reduz a sua sobrevivência, tornando-os rígidos, favorecendo o seu catabolismo rápido, com ocorrência de hemólise acentuada e episódios de infartos teciduais (WEATHERALL e PROVAN, 2000; BRASIL, 2001; TAYLOR et al., 2008). A AF também apresenta complicações clínicas heterogêneas, tais como crises de sequestro esplênico; acidente vascular cerebral (AVC); complicações renais; priapismo; alterações pulmonares, como a síndrome torácica aguda (STA) e a hipertensão pulmonar; crises recorrentes de dor e fenômenos de vaso-oclusão (SCHNOG et al., 2004; GLADWIN e KATO, 2005; TAYLOR et al., 2008).

A DF está presente em cerca de 7% da população mundial, com prevalência elevada nos países da África, América do Sul, América Central, Arábia Saudita e Índia (WEATHERALL e CLEGG, 2001). Esta é a doença hematológica de origem genética mais prevalente nos Estados Unidos, acometendo cerca de 70.000 pessoas, incluindo uma média de 01 nascido vivo com a anemia falciforme para cada 3500 afro-descendentes recém-nascidos anualmente (HASSELL, 2010). Conforme dados da Organização Mundial de Saúde (OMS), estima-se que nasçam cerca de 270 mil crianças com a DF, por ano, na África (BRASIL, 2009). A distribuição mundial do alelo  $\beta^S$  está representada na Figura 2.

A DF é a doença hereditária monogênica mais comum no Brasil, com mais de dois milhões de portadores do alelo  $\beta^S$  (gene da HbS). Estima-se o nascimento de 700 a 1.000 casos novos anuais de pacientes com DF, sendo que nasce uma criança com AF para cada mil recém-nascidos vivos (GONCALVES et al., 2003; CANÇADO e JESUS, 2007).

A distribuição da doença ocorre de forma heterogênea, com prevalência elevada nos estados que possuem concentração maior de afrodescendentes, ocorrendo também em brancos (BRASIL, 2001). Estima-se que 4% da população brasileira seja heterozigota HbAS, sendo que essa proporção aumenta em até 12% entre os afrodescendentes. Alvares-Filho e colaboradores (1995), ao estudarem 67.667 amostras de sangue de indivíduos provenientes de 48 cidades brasileiras,

descreveram a frequência de 2,2% para os indivíduos HbAS (ALVARES FILHO et al., 1995).

Atualmente, com base nos dados provenientes da triagem neonatal realizada pela Associação de Pais e Amigos dos Excepcionais (APAE) – BA sabe-se que a incidência e prevalência, na Bahia, da DF, é uma das maiores do Brasil, acometendo um a cada 645 nascidos-vivos (SILVA et al., 2006). As regiões Norte e Nordeste apresentam as frequências mais elevadas dos heterozigotos HbAS, correspondendo a 6% e 10%, respectivamente, enquanto as demais regiões brasileiras não chegam a somar 5% (CANÇADO e JESUS, 2007).

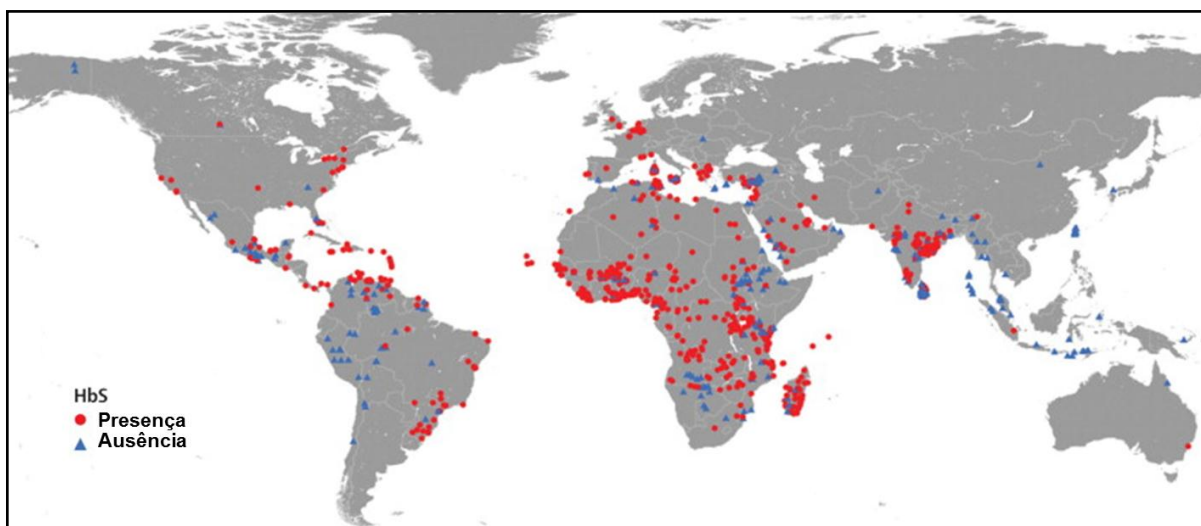


Figura 2. Distribuição global do alelo  $\beta^S$ . Figura adaptada (REES e GIBSON, 2012).

A gravidade da DF aponta para uma contribuição elevada no número de óbitos de jovens no Brasil, sendo que cerca de 80% das mortes ocorrem nos indivíduos com AF antes dos 30 anos e, aproximadamente, 40% acometem menores de nove anos. Esses números de idade baixa no óbito refletem a dificuldade no diagnóstico precoce e no acesso às medidas de prevenção às infecções, e a falta de orientação entre os familiares sobre como proceder aos primeiros sinais de complicações (LOUREIRO e ROZENFELD, 2005).

## 2.2 Manifestações Clínicas e Fisiopatologia

Na HbS, a troca do ácido glutâmico, aminoácido hidrofílico, pela valina, que é hidrofóbica, favorece, durante as fases de desoxigenação, interações hidrofóbicas, entre moléculas vizinhas, culminando em estruturas poliméricas, as quais deformam a hemácia. Em condições de hipóxia, acidez e desidratação celular, a polimerização da Hb leva à deformação da estrutura da hemácia pelo fenômeno denominado falcização. Esse fenômeno é reversível durante a oxigenação, enquanto as hemácias não sofrerem lesões em sua membrana. Entretanto, falcizações repetitivas, podem levar a alterações definitivas na membrana eritrocitária, tornando o seu formato irreversivelmente falcizado (BRASIL, 2001; STEINBERG, 2008).

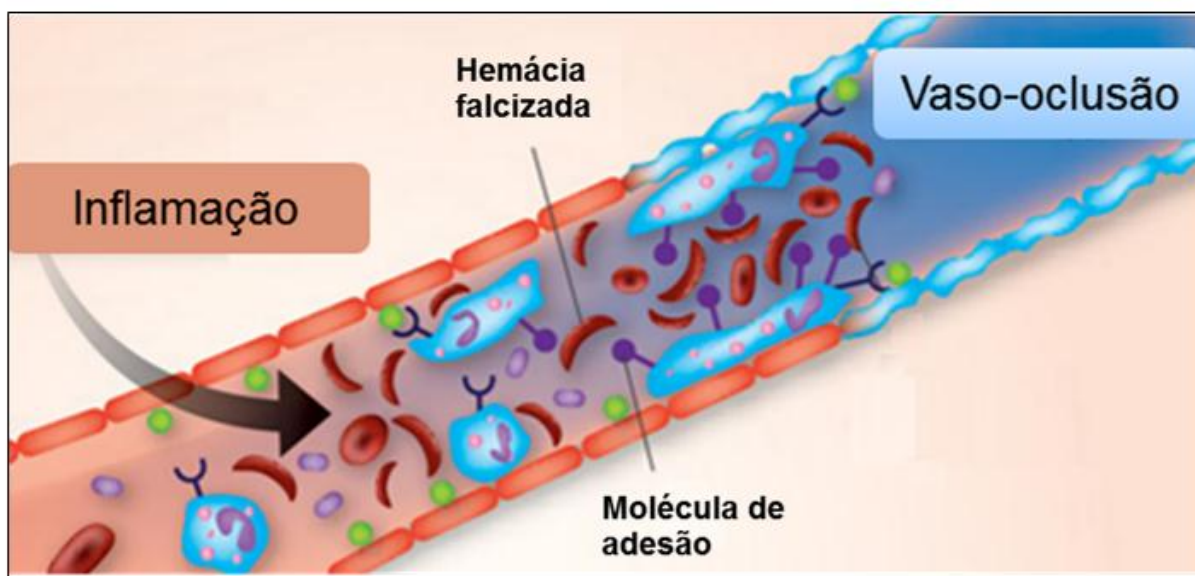
A cinética de falcização depende do grau de desoxigenação, concentração intracelular de HbS e presença ou ausência de HbF. Os pacientes que possuem concentrações elevadas de HbF têm seus sintomas clínicos reduzidos devido à inibição desse fenômeno. Os eritrócitos falcizados possuem rigidez aumentada e vida-média reduzida, o que contribui para a instalação de um quadro de anemia hemolítica grave, com destruição tanto extravascular quanto intravascular, levando a redução da vida do eritrócito e o agravamento da anemia (BRASIL, 2001; SILVA, GONCALVES e MARTINS, 2004).

Os pacientes com AF possuem numerosas complicações que podem afetar quase todos os órgãos e sistemas, com morbidade expressiva, redução da capacidade de trabalho e da expectativa de vida. A interação dinâmica entre os eritrócitos do paciente com AF e o endotélio vascular contribui para os episódios de vaso-oclusão e isquemia, estresse vascular, expressão aumentada de citocinas inflamatórias e moléculas de adesão. Além disso, a hemólise crônica, presente nos quadros mais graves da AF, contribuem para a hipercoagulabilidade e vasculopatia, entre outros (FRANCIS e HAYWOOD, 1992; TURHAN et al., 2002; WOOD, HEBBEL e GRANGER, 2004; RAPHAEL, 2005; MORRIS, 2008).

A oclusão da microcirculação pelos eritrócitos falcizados leva à isquemia tecidual e danos em tecidos, sendo a causa responsável pelas complicações clínicas presentes na doença (SCHNOG et al., 2004). O fenômeno vaso-oclusivo presente na AF envolve a obstrução de microvasos, lesão tecidual, com inflamação local (STUART e NAGEL, 2004). Tanto as hemácias quanto reticulócitos dos pacientes com AF expressam em sua superfície moléculas de adesão, como a integrina  $\alpha_4\beta_1$



(FRENETTE e ATWEH, 2007; ALSHAIBAN et al., 2015). A ativação e adesão leucocitária nos microvasos é também um fator de risco para o processo de vaso-oclusão, pois implica na ativação do ambiente em cascata, com liberação de citocinas e radicais livres (TURHAN et al., 2002). A Figura 3 resume alguns eventos envolvidos no processo de vaso-oclusão presente na DF.



**Figura 3. Eventos fisiopatológicos presentes no desenvolvimento das crises vaso-oclusivas na doença falciforme.**

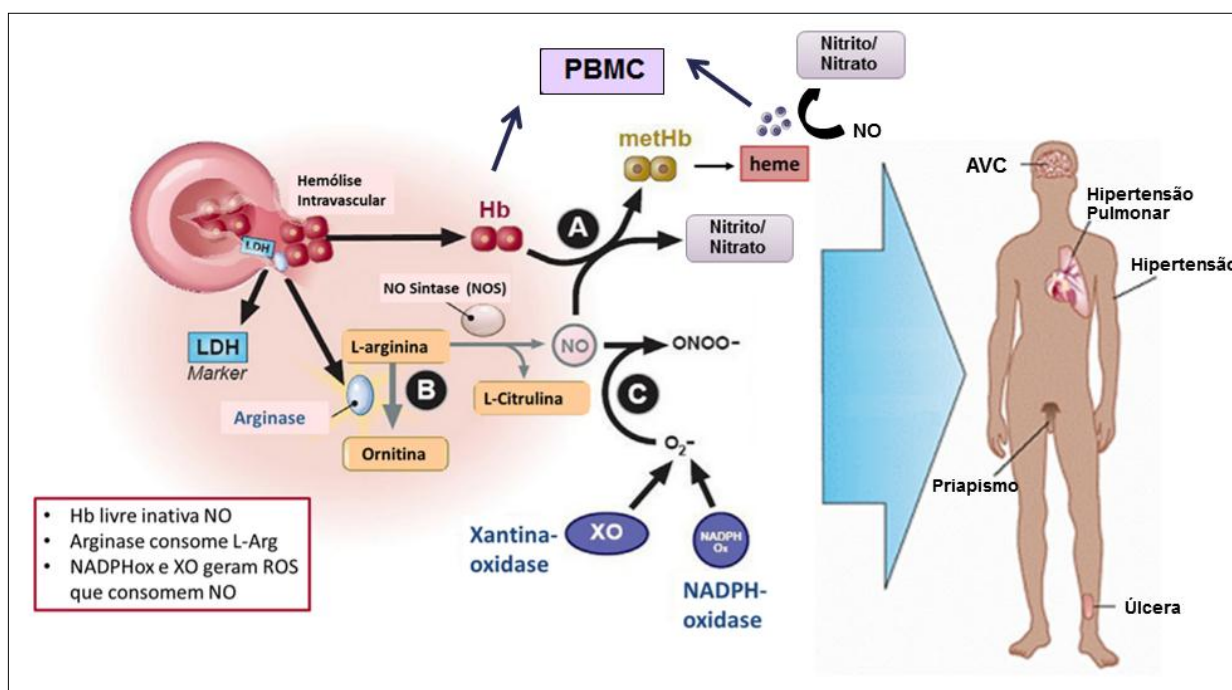
O processo de vaso-oclusão parece envolver várias etapas, incluindo a adesão de reticulócitos ao endotélio, redução do fluxo sanguíneo, expressão de moléculas de adesão e propagação da hemácia falcizada. Adaptado de (SEGEL, HALTERMAN e LICHTMAN, 2010).

### 2.3 Hemólise e Óxido Nítrico

A hemólise intravascular é o principal fator responsável pela fisiopatologia da DF. Essa lise nas hemácias (RBCs, *red blood cells*) promove liberação de hemoglobina (Hb) livre no plasma, apresentando efeitos inflamatórios e oxidantes que contribuem para a disfunção endotelial. Outros produtos da hemólise, incluindo heme, ROS e de RNS são liberados na corrente sanguínea, levando ao aumento de estresse oxidativo e decréscimo dos níveis de NO. Esse contexto oxidativo e inflamatório contribui para a ativação de hemácias, leucócitos, plaquetas e células

endoteliais, as quais, por sua vez, mantêm o ciclo inflamatório, com mais produção de ROS e citocinas pró-inflamatórias (VILAS-BOAS et al., 2010; DUTRA et al., 2014).

A lise das hemácias também libera arginase, uma enzima que tem como substrato o aminoácido L-arginina, essencial para a produção do NO, levando à redução do mesmo e à vasoconstrição. A biodisponibilidade dessa molécula está significativamente relacionada a vaso-oclusão. Sua principal função é regular a vasodilatação e manter o tônus vascular, atuando no controle da expressão das moléculas de adesão nas células endoteliais e ativação leucocitária. A Hb liberada durante a hemólise é capaz de converter o NO em seu metabólito inativo reduzindo sua biodisponibilidade no plasma. Conseqüentemente, os pacientes com AF passam a ter resistência à dilatação do vaso e aumento da adesão das células no endotélio (REITER et al., 2002; ZAGO e PINTO, 2007; BELANGER et al., 2015). A hemólise e suas conseqüências sobre o metabolismo do NO estão representadas na Figura 4.



**Figura 4. Representação das moléculas envolvidas na hemólise intravascular e bioatividade do NO na anemia falciforme.**

O processo de hemólise inicia um ataque global à via da arginina-NO. A hemoglobina livre e a formação de radicais livres rapidamente reagem e destroem o NO. A liberação de arginase pelo eritrócito diminui os níveis de arginina, principal substrato para a formação do NO, diminuindo ainda mais a síntese de NO levando às alterações vasculares e ao processo de vaso-oclusão. Figura adaptada (STEINBERG, 2008).

O NO, principal responsável pela manutenção do tônus vascular, é formado a partir da L-arginina e do oxigênio molecular em uma reação catalisada pela enzima NOS (ROMERO et al., 2002). O NO é constitutivamente sintetizado e liberado principalmente pelas células endoteliais vasculares e fisiologicamente inibe diversos componentes do processo aterogênico, como vasoconstricção, agregação plaquetária, proliferação do músculo liso vascular e adesão de leucócitos ao endotélio (FORGIONE, LEOPOLD e LOSCALZO, 2000).

A diminuição da biodisponibilidade do NO durante a hemólise contribui para o desequilíbrio vascular, uma condição presente na disfunção endotelial (DE). Essa condição leva ao aumento da expressão de moléculas como a molécula de adesão intercelular 1 (ICAM-1), proteína de adesão celular vascular 1 (VCAM-1) e endotelina-1, aumento da ativação plaquetária e dano na reperfusão isquêmica (ROTHER et al., 2005; WOOD, HSU e GLADWIN, 2008; VILAS-BOAS et al., 2010).

A redução do NO pelos produtos gerados no processo inflamatório causa também danos endoteliais via ativação transcricional de moléculas vasoconstritoras, como a endotelina-1 (ROTHER et al., 2005). Esta molécula possui características contrárias à do NO, uma vez que apresenta a mais potente atividade vasoconstritora descrita em humanos, sendo que em pacientes com AF, seus níveis séricos estão elevados durante as crises vaso-oclusivas (GRAIDO-GONZALEZ et al., 1998; ERGUL et al., 2004).

Os pacientes com AF em estado estável apresentam concentrações reduzidas de NO (BELHASSEN et al., 2001; VILAS-BOAS et al., 2010). Essa redução, quando associada ao estado inflamatório crônico (KATO et al., 2009) aumenta, provavelmente, a ativação de fatores de coagulação, em especial o fator tecidual (FT) (SOLOVEY et al., 2010), além de modular outras moléculas como a fosfatidilserina (FS), pelos eritrócitos, e receptor de proteína C reativa (RPCR) (GU et al., 2000; SETTY, KULKARNI e STUART, 2002).

Portanto, o NO desempenha papel fundamental na patogênese da AF, pois, nesta condição, suas propriedades vasodilatadora e antitrombogênica encontram-se comprometidas, e a vasoconstricção aliada à adesão de células circulantes podem levar à oclusão de microvasos.

## 2.4 Terapia Farmacológica na Doença Falciforme: Hidroxiureia

Os pacientes com DF em crise vaso-oclusiva necessitam de uma terapia farmacológica a fim de aliviar as manifestações clínicas. Até o presente momento, o único tratamento farmacológico utilizado nestes pacientes é a hidroxiureia (HU). A terapia com HU foi aprovada, em 1998, para o uso em pacientes com DF sintomática, pela *United States Food Drug Administration* (FDA), e em 2010, pelo Ministério da Saúde (BRASIL, 2010).

Inúmeros estudos têm reportado a eficácia da HU em pessoas com DF por conduzir à melhora clínica e hematológica pela redução da incidência de episódios vaso-oclusivos. A HU é uma droga antineoplásica, citotóxica, mas que apresenta vários efeitos benéficos em pacientes com DF, tais como: aumento da produção de HbF, aumento da hidratação do glóbulo vermelho, aumento na concentração de Hb, aumento na produção de NO e diminuição da expressão de moléculas de adesão (BRASIL, 2010; STROUSE e HEENEY, 2012; CUNNINGHAM-MYRIE et al., 2015).

Como mecanismo de ação efetivo para a DF, a HU atua inibindo a ribonucleotídeo redutase, uma enzima que catalisa a conversão redutiva de ribonucleotídeos em desoxirribonucleotídeos, sendo esta a etapa limitante da velocidade de síntese de DNA (OSTERMAN GOLKAR et al., 2013; GUAN et al., 2015). Embora tenha efeito citotóxico, é esta propriedade que a torna importante e singular no tratamento de pacientes com AF. Sua toxicidade está associada a supressão de precursores eritróides com ciclagem mais rápida, favorece a maior duração de precursores mais primitivos (Células F) e de ciclagem mais lenta, quiescentes e contendo HbF, forma predominante no feto e como prescinde das cadeias  $\beta$  globina, não tem sua estrutura afetada pela mutação nos genes das mesmas (MORRIS et al., 2003; STEINBERG et al., 2010).

Outro benefício do tratamento com HU é seu papel de “doador de NO”. O metabolismo desse fármaco resulta na produção de NO, o qual compensa a redução do mesmo no processo de hemólise crônica. O NO ativa o sistema efetor guanilato ciclase que, por sua vez, leva ao aumento dos níveis intracelulares de monofosfato cíclico de guanosina (GMPc), o qual interage com fatores de transcrição estimulando diretamente a produção de células F e contribuindo para o aumento da Hb fetal nas hemácias. Esse aumento de HbF contribui, portanto, para a diminuição percentual

da HbS, e redução da hemólise crônica (GLADWIN et al., 2002; NAHAVANDI et al., 2002; COKIC et al., 2008).

## **2.5 Polimorfismos nos Genes da Mieloperoxidase e da Alfa-1 Antitripsina**

A mieloperoxidase (MPO) é uma proteína relacionada à inflamação e proteção contra infecções, abundante em neutrófilos e monócitos. Em níveis elevados, a MPO contribui significativamente para a amplificação da resposta inflamatória vascular, condição constante em pacientes com DF. A enzima catalisa a formação de ROS e RNS, que apresentam capacidade oxidante elevada e podem comprometer a integridade do endotélio vascular (ABU-SOUD e HAZEN, 2000). A MPO modula a resposta inflamatória vascular, sendo que seus níveis elevados são preditores da disfunção endotelial e contribuem para a redução da biodisponibilidade do NO, já que esta enzima é uma NO oxidase (EISERICH et al., 2002; GALIJASEVIC et al., 2006; ZHANG et al., 2013) Uma vez que a MPO e os produtos derivados de sua atividade enzimática estão aumentados nos sítios inflamatórios (EISERICH et al., 2002), pacientes com DF, principalmente durante os episódios de crise (REES, WILLIAMS e GLADWIN, 2010) ou infecção (COSTA et al., 2005), apresentam níveis séricos elevados de MPO (VILLAESCUSA et al., 1999), sugerindo que esta enzima pode contribuir diretamente para a resposta vascular.

Além do papel modulador no processo inflamatório, crescentes evidências demonstram o papel da MPO como agente da resposta frente a patógenos. Infecções tais como pneumonia, meningite, infecções urinárias e septicemia constituem uma causa comum de hospitalização em pacientes com DF, principalmente, em pacientes com AF (COSTA et al., 2005), condições estas relacionadas ao aumento da contagem de leucócitos (MTATIRO et al., 2015) e dos níveis séricos de MPO. Sabe-se que a MPO, única enzima humana capaz de gerar hipoclorito (HOCl) em meio contendo cloreto e peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), é liberada logo após ativação celular, exercendo papel essencial nos mecanismos de defesa do sistema imune (KLEBANOFF, 1970; HANSSON, OLSSON e NAUSEEF, 2006; SHAEIB et al., 2015).

Sabe-se que a gravidade da DF varia bastante entre os indivíduos e esta variabilidade fenotípica costuma estar relacionada a alterações genotípicas. Sendo a MPO uma enzima altamente polimórfica, o polimorfismo localizado na região

promotora (-463G>A, troca de G por A) do gene *MPO* tem sido relacionado à redução na transcrição gênica dessa enzima (PIEDRAFITA et al., 1996; CASCORBI et al., 2000).

Como pacientes com DF apresentam quadro inflamatório crônico, especialmente durante os episódios de hemólise, crises vaso-oclusivas e síndrome torácica aguda (STA) (AMER et al., 2006; STEINBERG, 2008), e este polimorfismo é caracterizado pela redução da transcrição gênica de MPO (COSTA et al., 2005; REYNOLDS et al., 2006), esta mutação poderia estar associada às manifestações clínicas da doença. A presença desse polimorfismo em pacientes com DF está associada à ocorrência de infecções bacterianas, especialmente em indivíduos com AF (COSTA et al., 2005; BARBOSA et al., 2014), e a deficiência de MPO tem sido associada ao aumento da ocorrência de processos inflamatórios (CASCORBI et al., 2000).

A distribuição desse polimorfismo mostra que cerca de 2-10% da população geral apresentam o alelo polimórfico em homozigose (AA), cerca de 30-40% são heterozigotos (GA) e 60-70% são homozigotos para o alelo selvagem (GG) (DALLY et al., 2002; FEYLER et al., 2002; ZHONG et al., 2009). Indivíduos com o alelo A (GA ou AA) apresentam expressão reduzida de MPO em até três vezes quando comparados ao grupo com genótipo selvagem. O genótipo AA corresponde à forma mais grave do polimorfismo, implicando em níveis séricos diminuídos e atividade reduzida da MPO (REYNOLDS et al., 2006).

Outra proteína relacionada à inflamação e que também exhibe polimorfismo genético é a alfa-1 antitripsina (AAT). Esta glicoproteína de fase aguda é altamente polimórfica e sua síntese é controlada pelo gene *SERPINA1*, localizado no *locus* do inibidor de protease (Pi), no cromossomo 14q32.1, em resposta a diversas citocinas, tais como IL-1, fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF  $\alpha$ ) e, principalmente, IL-6 (RICHARDS, GAULDIE e BAUMANN, 1991; LOMAS e MAHADEVA, 2002; CHAPPELL et al., 2006). Após sua síntese, predominantemente em hepatócitos, a AAT é secretada no plasma, espalhando-se por todo o corpo. Os níveis séricos da AAT aumentam durante o processo inflamatório ou lesão tecidual e estão relacionados com a inibição de proteases, especialmente a elastase, uma protease de serina produzida por neutrófilos, que tem a capacidade de hidrolisar as fibras de elastina no pulmão e relacionada à patogênese da DF (RUDNICK e PERLMUTTER, 2005; GRUBER, NADIR e HAAS, 2010). Os níveis plasmáticos de elastase estão

elevados em indivíduos com DF assintomáticos em relação a controles sadios, e esses níveis aumentam significativamente em pacientes em crise vaso-oclusiva (LARD et al., 1999). Além da inibição de proteases, estudos têm mostrado que a AAT modula a função de células do sistema imune, tais como neutrófilos (BERGIN et al., 2010), monócitos (JANCIAUSKIENE, NITA e STEVENS, 2007) e linfócitos (LU et al., 2006), e contribui para a supressão da síntese de citocinas pró-inflamatórias (POTT et al., 2009).

O gene codificante para AAT, *SERPINA1*, é altamente polimórfico com mais de 125 polimorfismos de nucleotídeo único (*single nucleotide polymorphism*, SNP). As formas variantes de AAT são classificadas como inibidor de protease “Pi” (*Protease inhibitor*). As formas variantes “normais” de AAT apresentam níveis séricos normais (20-50  $\mu\text{M}$ ) e atividade de inibição de protease funcional, representadas pelo alelo selvagem M. Entretanto, as variantes para “deficiência” (ou seja, redução da concentração sérica da AAT ou presença de genótipo alterado) estão associadas com concentrações séricas dessa proteína menores do que os valores encontrados em indivíduos com variantes normais, representadas principalmente pelos alelos S e Z, sendo este último associado à forma mais grave de deficiência de AAT (GOOPTU, DICKENS e LOMAS, 2014).

A homozigose para o alelo Pi\*Z tem cerca de 10-15% dos níveis normais de AAT, sendo esta condição um fator de risco para o desenvolvimento de complicações pulmonares, como enfisema, e, sistemicamente, para infecção. Indivíduos heterozigotos para esse alelo (Pi\*MZ) produzem cerca de 50 % dos níveis normais de AAT, produzidos pelos indivíduos sem o alelo mutante, ou seja, homozigotos para o alelo selvagem (Pi\*MM) (STOCKLEY, 2014). O alelo Pi\*S é mais frequente que o alelo Pi\*Z. Em contraste ao alelo Z, os níveis de AAT, em indivíduos homozigotos para o alelo Pi\*SS, são reduzidos cerca de 60% em relação aos indivíduos com o genótipo Pi\*MM, sendo que essa variante não está relacionada à inibição da elastase neutrofílica. Em indivíduos heterozigotos Pi\*MS, os níveis de AAT correspondem cerca de 75% da concentração sérica dos indivíduos normais. Entretanto, a combinação dessa variante com o alelo Z (Pi\*SZ) reduz significativamente os níveis circulantes dessa proteína, alcançando uma concentração sérica de apenas 35% da encontrada em indivíduos Pi\*MM. A presença desse genótipo (Pi\*SZ) aumenta o risco de doenças, incluindo a doença pulmonar e cirrose hepática (TURINO et al., 1996; STOCKLEY e TURNER, 2014).

## 2.6 Resposta Imune Inata

### 2.6.1 Receptores do Tipo Toll (TLRS)

Os receptores do tipo Toll (TLR) são uma família de proteínas conservadas evolutivamente para reconhecerem alguns DAMPs (IMAI et al., 2008; LEFEBVRE et al., 2011) e PAMPs associados a vírus, bactérias, parasitas ou fungos (KUMAR et al., 2014; SMITH et al., 2014; TOMLINSON et al., 2014; WAGENER et al., 2014). Estes receptores são amplamente distribuídos nas células do sistema imune inato, sendo importantes não apenas na ativação da resposta inata, como principalmente na iniciação e estabelecimento da resposta imune adaptativa (MEDZHITOV, PRESTON-HURLBURT e JANEWAY, 1997).

Foram descritos, em humanos, 10 TLRs (TLR1 ao TLR10), cada um dos quais apresenta certa especificidade para determinado PAMP ou DAMP (Figura 5). O TLR10 era o único TLR encontrado em humanos que, até recentemente, não possuía ligantes conhecidos (CHUANG e ULEVITCH, 2001). Apesar do ligante do TLR10 ainda não ser conhecido, um estudo demonstrou forte associação deste TLR na defesa contra infecção bacteriana na mucosa intestinal (REGAN et al., 2013).

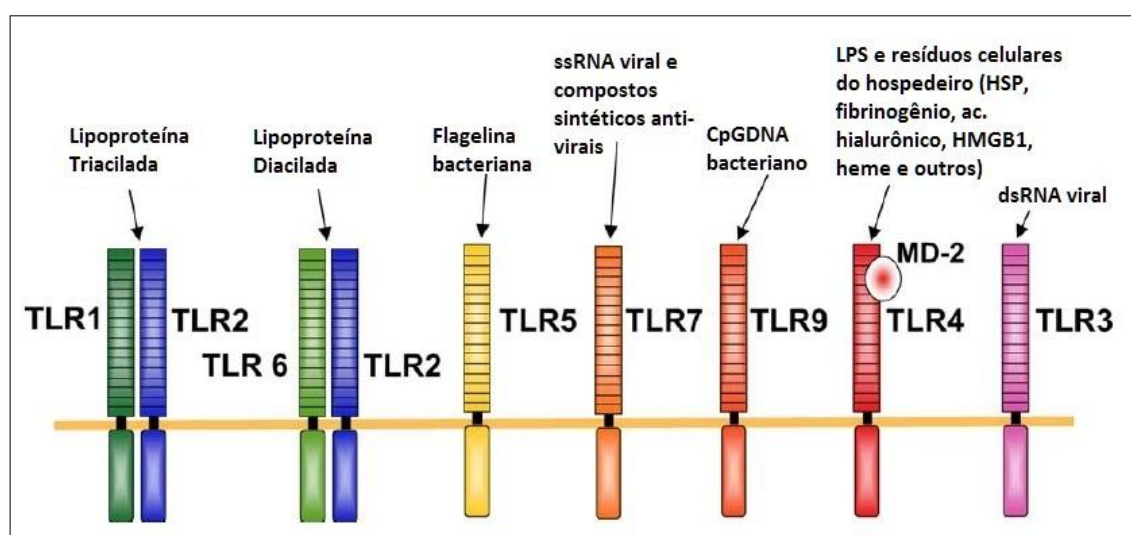


Figura 5. Toll-like receptors (TLR) e seus ligantes (PAMPs e DAMPs). Adaptado de (TAKEDA e AKIRA, 2004).



Dentre os receptores do tipo Toll mais bem estudados e descritos, o TLR2, TLR4, TLR5 e TLR9 apresentam características importantes na indução de resposta inflamatória do hospedeiro. O TLR2 é importante para a resposta contra bactérias Gram-positivas, já que reconhecem peptidoglicanos da sua parede celular. Entretanto, como o TLR2 forma heterodímeros, outros PAMPs também têm sido associados com ativação deste receptor (TAKEUCHI et al., 1999; OZINSKY et al., 2000). Além de participar da defesa contra patógenos, o TLR2 é capaz ainda de responder contra DAMPs endógenos, num processo de inflamação estéril. Os principais DAMPs agonistas de TLR2 são a beta-2-Glicoproteína I e os beta-amilóides (ALARD et al., 2010; LIU et al., 2012; VAN BERGENHENEGOUWEN et al., 2013). Quando o TLR2 está formando heterodímero com o TLR4, este complexo pode ser ativado por hemoglobina (WANG et al., 2014).

O TLR4 é um receptor que reconhece um dos PAMPs mais bem descritos, o lipopolissacarídeo (LPS), além de reconhecer resíduos celulares endógenos que atuam como DAMPs após lesão celular. Os principais DAMPs agonistas de TLR4 são HMGB1 (Proteína do Grupo 1 de Mobilidade Alta), HSP (Proteína de Choque Térmico),  $\beta$ -defensina, ácido hialurônico, grupo heme, dentre outros (IMAI et al., 2008; LEFEBVRE et al., 2011; BELCHER et al., 2014; GUPTA, 2014; CAI et al., 2015; NAIR et al., 2015).

A ativação do TLR5 ocorre principalmente por infecção por patógenos flagelados, como *Salmonella spp.* (TAKEDA e AKIRA, 2004). Este é um receptor que reconhece apenas PAMP (flagelina), não havendo nenhum DAMP ainda descrito capaz de ativá-lo. Entretanto, apesar do principal agonista do TLR5 ser a flagelina, alguns estudos demonstraram associação entre a expressão deste receptor, polimorfismos e gravidade e prognóstico de diferentes tipos de tumor de mucosa e outras doenças inflamatórias crônicas, sugerindo que o TLR5 pode ser um biomarcador de prognóstico destas condições (KIM et al., 2008; PIMENTEL-NUNES et al., 2011; WANG et al., 2012; KAUPPILA et al., 2013; SHERIDAN et al., 2013).

O TLR9 é um receptor que reconhece DNA de cadeia simples associado a motivos CpG não metilados, o qual é raro em DNA eucariótico e abundante em DNA bacteriano (BAUER, 2013). Entretanto, alguns autores sugerem que o TLR9 seja capaz de reconhecer DNA próprio, tanto mitocondrial quanto nuclear, estando associado a imunopatogênese de doenças inflamatórias, como o lúpus eritematoso sistêmico (LEADBETTER et al., 2002; BARRAT et al., 2005; ZHANG et al., 2010).

À exceção do TLR3, todos os outros TLRs sinalizam sua ativação por meio da proteína adaptadora MyD88. O recrutamento desta molécula induz a ativação de uma família de quinases (IRAK) e do fator 6 associado ao receptor do fator de necrose tumoral (TRAF6), as quais levam à liberação e translocação do NF- $\kappa$ B para o núcleo da célula e, conseqüente, aumento da expressão gênica de citocinas pró-inflamatórias (LIEW et al., 2005). Estas moléculas pró-inflamatórias participam da defesa do hospedeiro contra patógenos invasores, mas podem ainda estar envolvidas na patogênese de doenças autoimunes e inflamatórias crônicas como diabetes (KAYSEROVA et al., 2014), lúpus eritematoso sistêmico (LYN-COOK et al., 2014), asma (SHIKHAGAIE et al., 2014) e DF (GHOSH et al., 2013; BELCHER et al., 2014).

Na AF, as células endoteliais, leucócitos e plaquetas estão constantemente expostos a ação do heme e Hb provenientes da hemólise intravascular, frequentemente observada nestes casos, o que leva a um estado de inflamação sistêmica e fenômenos pró-trombóticos (BELCHER et al., 2003; WOOD, HEBBEL e GRANGER, 2004). O heme é capaz de ativar diretamente a sinalização via TLR4 em células endoteliais, levando à ativação do NF- $\kappa$ B. Esta via induz liberação dos constituintes dos corpos de Weibel-Palade (WPB), p-selectina e fator de von Willebrand (VWF), para o endotélio vascular, ocasionando fenômenos de vaso-occlusão em modelo experimental de DF (FIGUEIREDO et al., 2007; BELCHER et al., 2014).

Por outro lado, a Hb liberada durante a hemólise intravascular, além de interagir diretamente com TLR4, pode ainda associar-se a certos PAMPs ou DAMPs, sendo importantes na ativação do sistema imune inato. Análise *in silico* demonstrou que a molécula de Hb é capaz, por exemplo, de interagir com LPS, resultando em possível alteração conformacional e conversão para meta-hemoglobina (BAHL et al., 2011).

Além da heme e da Hb serem importantes na ativação da resposta imune inata, tem sido demonstrado que hemácias íntegras também participam do processo inflamatório observado na AF. As células endoteliais ativadas por hemácias íntegras produzem HMGB1, um DAMP agonista de TLR4 altamente expresso na DF, induzindo inflamação e necroptose (morte celular programada por necrose) de células endoteliais (GUPTA, 2014; QING et al., 2014; XU et al., 2014).

Alguns estudos têm demonstrado que a incubação de Hb com ligantes de TLRs e PAMPs estimula, de forma sinérgica, a produção das citocinas pró-inflamatórias IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 e TNF por macrófagos (BODET, CHANDAD e GRENIER, 2007; LIN et al., 2010). Estes dados em conjunto, associados à presença de DAMPs durante a hemólise intravascular e ao estado inflamatório observado na AF, sugerem que outras vias de ativação do sistema imune inato estejam participando deste processo, como os receptores do tipo NOD e o inflamassoma.

### *2.6.2 Receptores do Tipo NOD (NLRs) e o Inflamassoma*

Os receptores do tipo NOD (NLRs) representam uma superfamília dos receptores de reconhecimento padrão (PRR) que foram descritos inicialmente há cerca de 15 anos (BERTIN et al., 1999; INOHARA et al., 1999). Há um total de 22 genes humanos relacionados com os NLRs, os quais são agrupados em cinco subfamílias (NLRA, NLRB, NLRC, NLRP e NLRX) a depender do seu domínio efetor N-terminal, compreendendo, normalmente, um domínio efetor pirina (PYD) ou de recrutamento e ativação de caspase (CARD). Todas as NLRs contêm ainda um domínio central para oligomerização e ligação de nucleotídeo (NACHT), e um domínio de repetição rico em leucina (LRR) na sua porção C-terminal (TING et al., 2008; YERETSSIAN, 2012).

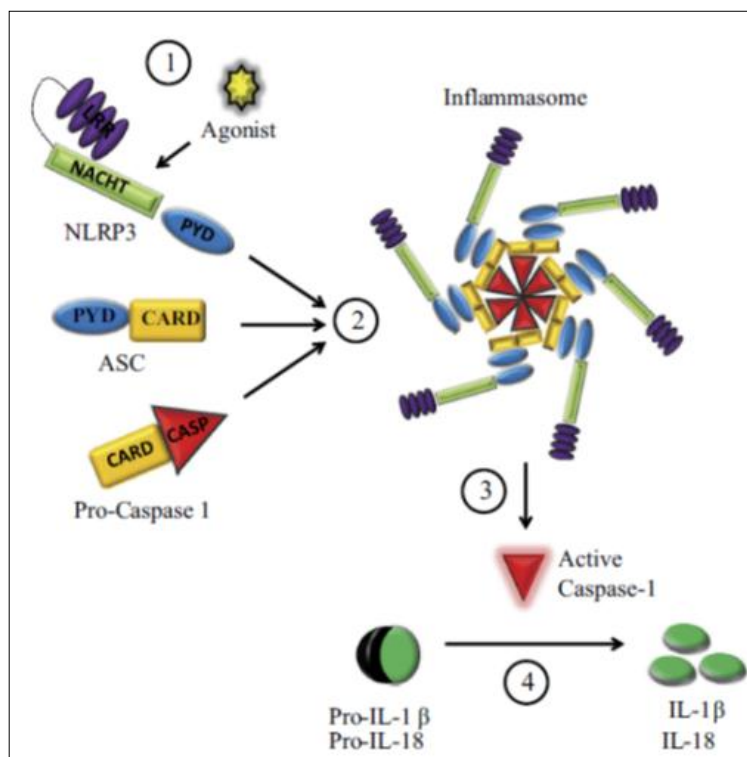
O NLRA possui um domínio N-terminal de transativação ácida, chamado de CIITA, atuando como regulador transcricional da apresentação de antígenos via MHC classe II. O NLRB (NAIP) apresenta um domínio de repetição de inibição de apoptose de baculovírus, estando associado a defesa do hospedeiro e sobrevivência celular. A subfamília NLRC apresenta cinco membros (NLRC 1 a 5), sendo o NLRC1 (NOD1) e NLRC2 (NOD2) os mais bem descritos. Estes receptores reconhecem peptidoglicanos presentes na parede celular de bactérias, sendo fundamentais para manutenção da homeostasia tecidual e defesa contra agentes bacterianos. O NLRX1, único membro descrito da família dos NLRX, possui na região N-terminal uma sequência-alvo que permite seu tráfego pela membrana mitocondrial (NICKERSON et al., 2001; DIEZ et al., 2003; WRIGHT et al., 2003; LIGHTFIELD et al., 2008; PHILPOTT et al., 2014).

A subfamília dos NLRPs (também conhecidos como NALPs) possui 14 membros descritos (NLRP 1 a 14), todos com um domínio PYD N-terminal. Uma das

principais funções destes receptores é a formação de uma plataforma proteica inflamatória após sua oligomerização, chamada de “inflamassoma”, a qual controla a produção de citocinas pró-inflamatórias como a IL-1 beta e a IL-18. Apesar de várias plataformas de inflamassoma já terem sido descritas, o inflamassoma associado ao NLRP3 (ou NALP3) é o mais comumente estudado (MARTINON, BURNS e TSCHOPP, 2002; SCHRODER e TSCHOPP, 2010; LATZ, XIAO e STUTZ, 2013).

Classicamente o inflamassoma consiste de NLRP (NLRP3 é mais comum), da protease inflamatória caspase-1 e da proteína associada a apoptose (ASC) (MARTINON, BURNS e TSCHOPP, 2002). O NLRP3 é expresso em uma variedade de tipos celulares, incluindo neutrófilos, células dendríticas, células epiteliais, monócitos e linfócitos T. Diversos PAMPs de vírus, bactérias e fungos foram descritos como sendo ativadores do NLRP3, além de alguns DAMPs, como ATP e glicose, dentre outros (Revisado por SCHRODER e TSCHOPP, 2010). Após sua ativação, o NLRP3 recruta ASC e pro-caspase-1, as quais são necessárias para a síntese das citocinas pró-inflamatórias IL-1 $\beta$  e IL-18 e, conseqüente, morte das células inflamatórias, num processo dependente de caspase-1 chamado de piroptose (AGOSTINI et al., 2004; MARTINON et al., 2006; BERGSBAKEN, FINK e COOKSON, 2009).

A formação do inflamassoma é um processo de duas etapas. Como o nível basal de NLRP3 é insuficiente para iniciar a formação do inflamassoma, é necessário que haja a participação de NF- $\kappa$ B proveniente da via do TLR, sendo este o primeiro sinal para ativação do inflamassoma. Apesar de este ser o caminho comumente percorrido para ativação do inflamassoma, existem ainda algumas evidências científicas de ativação desta plataforma proteica independente de TLR, em resposta, por exemplo, ao estímulo por LPS, citocinas ou ROS. Adicionalmente, a presença de ROS parece ser fundamental para o estabelecimento do inflamassoma (BAUERNFEIND et al., 2009; BAUERNFEIND et al., 2011; ZHOU et al., 2011; GHONIME et al., 2014). O segundo sinal para ativação do inflamassoma é a própria oligomerização do NLRP3, a qual leva à formação de caspase-1 ativa e, conseqüente, conversão de pro-IL-1 $\beta$  e pro-IL18 em suas formas ativas que são secretadas no ambiente extracelular (Figura 6) (MARIATHASAN e MONACK, 2007).



**Figura 6. Ativação do inflamassoma do NLRP3.**

(1) Estimulação de NLRP3 por agonistas (PAMPs e/ou DAMPs); (2) recrutamento de pro-caspase-1 e ASC, possibilitando oligomerização do NLRP3 e formação do inflamassoma; (3) processo auto catalítico gerando caspase-1 ativa; (4) clivagem dos precursores pro-IL-1 $\beta$  e pro-IL18 nas suas formas ativas (DOS SANTOS, KUTUZOV e RIDGE, 2012).

As interleucinas IL-1 $\beta$  e IL-18 pertencem à superfamília da interleucina-1, a qual ainda compreende a citocinas mais recentes IL-33, IL-36 e IL-37. Estas estão relacionadas entre si pela sua origem, estrutura do receptor ou via de transdução do sinal (DINARELLO, 2009; DINARELLO et al., 2010). A IL-1 $\beta$  é uma citocina não expressa constitutivamente, mas induzida pela estimulação de sinais inflamatórios. Esta citocina existe no citoplasma celular na sua forma inativa, pro-IL-1 $\beta$ , apresentando atividade apenas após sua conversão mediada pela caspase-1, sendo um dos principais indutores de inflamação e febre (DINARELLO, 2013; JESUS e GOLDBACH-MANSKY, 2014). A citocina IL-18, entretanto, é expressa constitutivamente em alguns tipos de células, como em PBMC (PUREN, FANTUZZI e DINARELLO, 1999), e está evolvida tanto na resposta imune inata quanto na adaptativa, sendo originalmente referida como IGIF (fator indutor de IFN- $\gamma$ ) devido à sua capacidade de estimular produção de IFN- $\gamma$  principalmente por células Th. O aumento na expressão e nos níveis circulantes de IL-1 $\beta$  e IL-18 tem sido associado

a diversas condições clínicas que cursam com processo inflamatório, como infecções, esclerose múltipla, câncer, doença de Alzheimer, artrite e AF (GUMA et al., 2010; CERQUEIRA et al., 2011; KITAZAWA et al., 2011; RAMIREZ-RAMIREZ et al., 2013; KETELUT-CARNEIRO et al., 2015; TAS et al., 2015; VICARI et al., 2015).

A AF é caracterizada por um estado inflamatório intenso associado a expressão aumentada de moléculas de adesão nas células endoteliais, consequência da constante lesão destas células, além de hemólise, e concentrações plasmáticas elevadas de citocinas e outros mediadores inflamatórios (HEBBEL, 1997; PLATT, 2000). Na AF tem sido demonstrada, inclusive em população brasileira, a associação entre polimorfismos de IL-1 $\beta$  e complicações decorrentes da doença, como AVC (ASARE et al., 2010; VICARI et al., 2015). Adicionalmente, nosso grupo demonstrou que níveis plasmáticos de IL-18 estão correlacionados com marcadores de hemólise e disfunção endotelial (CERQUEIRA et al., 2011). Desta forma, o tratamento farmacológico do indivíduo com AF deve almejar, além da elevação dos níveis de HbF, a redução do processo inflamatório crônico observado nestes pacientes, interferindo na expressão de moléculas associadas às principais vias da inflamação, como o Toll e o NOD.

### 3 JUSTIFICATIVA

As complicações clínicas presentes na DF, principalmente na AF, estão diretamente relacionadas à hemólise, à disfunção do endotélio vascular, à amplificação da resposta vaso-oclusiva, que estão sempre relacionadas à morbimortalidade elevada desses pacientes, e ao estado ativado dos leucócitos circulantes (GILL et al., 1995; SCHNOG et al., 2004).

Sabe-se, ainda, que os mecanismos fisiopatológicos que induzem a variabilidade clínica apresentada por esses pacientes ainda não estão completamente elucidados, sendo que a identificação de moléculas envolvidas em complicações vasculares, principalmente nos quadros de oclusão vascular, pode contribuir para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas voltadas para o tratamento farmacológico mais direcionado a estas moléculas.

Até o presente momento, o único tratamento farmacológico aprovado mundialmente para o uso nesses pacientes é a hidroxiureia, um fármaco que atua na melhora clínica desses pacientes por induzir aumento na produção de HbF. Entretanto, não se sabe se esse fármaco poderia interferir diretamente nas vias inflamatórias ou influenciar na produção de moléculas associadas à inflamação naqueles pacientes com DF que apresentam polimorfismo em genes relacionados ao processo inflamatório.

Não há dúvidas de que a gravidade da doença, principalmente no que diz respeito à AF, é bastante divergente entre os pacientes. Uma das causas dessa diversidade clínica poderia ser a presença de alterações genéticas, tais como polimorfismos nos genes da *mieloperoxidase* (-463G>A) e *SERPINA1*, afetando, respectivamente, a mieloperoxidase e alfa-1 antitripsina - moléculas coadjuvantes do processo inflamatório apresentado pelos pacientes com DF.

Além disso, esses pacientes apresentam um quadro inflamatório persistente, o que poderia ser explicado pela constante ativação das vias dos receptores tipo Toll e NOD, as duas principais vias da inflamação. Vários trabalhos têm demonstrado que esses receptores são importantes no reconhecimento DAMPs derivados da resposta inflamatória levando a um ciclo de ativação constante da resposta imune inata. Porém, pouco se sabe a respeito da interação entre DAMPs decorrentes do quadro inflamatório dos pacientes com AF e os componentes formadores do inflamassoma ou relacionados à via do Toll.

Visto que a presença de polimorfismos em genes relacionados à inflamação, tais como *MPO* e *SERPINA1*, pode resultar em estados clínicos diversos nos pacientes com DF, e que as vias de sinalização mediadas por Toll e NOD podem ser críticas na ativação e manutenção da resposta inflamatória nesses pacientes, os estudos sobre a participação desses componentes da inflamação nas manifestações clínicas dos pacientes aliados à investigação sobre o possível efeito da HU nessas vias inflamatórias podem auxiliar no desenvolvimento de estratégias terapêuticas novas direcionadas a esses componentes, além de reforçar a participação destes como preditores de subfenótipos clínicos específicos nestes pacientes.



## 4 HIPÓTESES

### Hipótese 1

Polimorfismos nos genes *MPO-463G>A* e *SERPINA1* interferem na resposta ao tratamento com hidroxureia em pacientes com doença falciforme

### Hipótese 2

Hidroxureia não reduz diretamente a expressão gênica *in vitro* de receptores do tipo Toll em pacientes com anemia falciforme.

### Hipótese 3

Hidroxureia não reduz diretamente a expressão gênica *in vitro* de moléculas associadas ao inflamassoma via NLRP3.

## 5 OBJETIVOS

### 5.1 Objetivo Geral

Avaliar a associação dos polimorfismos nos genes da *MPO -463G>A* e da *SERPINA1* na resposta de pacientes com DF ao tratamento com hidroxiureia e o efeito da adição de hemácias falcizadas na expressão gênica de receptores tipo Toll ou componentes do inflamassoma em células mononucleares, tratadas ou não com hidroxiureia.

### 5.2 Objetivos Específicos

- 1) Avaliar parâmetros hematológicos e bioquímicos e sua associação com polimorfismos nos genes *MPO -463G>A* e *SERPINA1* em pacientes com doença falciforme tratados com HU;
- 2) Determinar a expressão de genes relacionados aos receptores do tipo Toll em células mononucleares (PBMC) de pacientes com anemia falciforme e de voluntários saudáveis;
- 3) Avaliar o efeito da adição de hemácias falcizadas na expressão de genes relacionados aos receptores do tipo Toll em cultura de PBMC de voluntários saudáveis, tratada ou não com hidroxiureia (HU);
- 4) Avaliar moléculas inflamatórias ( $LTB_4$  e nitrito) em sobrenadante de cultura de células mononucleares incubadas com hemácias falcizadas, lisadas ou íntegras, tratadas ou não com HU;
- 5) Determinar a expressão de genes relacionados a componentes do inflamassoma NLRP3 em PBMC de pacientes com anemia falciforme e de voluntários saudáveis;

6) Avaliar o efeito da adição de hemácias falcizadas na expressão de genes relacionados a componentes do inflamassoma NLRP3 em cultura de PBMC de voluntários sadios, tratada ou não com HU;

7) Avaliar proteínas relacionadas à ativação do inflamassoma (IL-1 $\beta$  e proteína ligadora de IL-18 [IL-18BP]) em sobrenadante de cultura de PBMC incubada com hemácias falcizadas tratada ou não com HU.

## 6 MANUSCRITOS

### 6.1 Manuscrito 1

**Título:** Sickle cell disease pharmacogenomics: implications on *SERPINA1* and *MPO* -463G>A gene polymorphisms and Hydroxyurea response.

**Autores:** Pitanga, T.N.; Carvalho, M.O.S.; Souza, A.L.C.S.; Santiago, R.P.; Oliveira, R. R.; Lopes, V.M.; Oliveira, R.R.; Gonçalves, M.S.

**Situação:** A ser submetido

**Objetivo:** *(referente ao objetivo 1 da tese):*

1. Avaliar parâmetros hematológicos e bioquímicos e sua associação com polimorfismos nos genes *MPO* -463G>A e *SERPINA1* em pacientes com doença falciforme tratados com HU.

**Principais resultados:** Pacientes com DF que exibem polimorfismo para os genes da *SERPINA1* ou *MPO* (-463G>A) mostram alterações em marcadores hematológicos e bioquímicos na resposta ao tratamento com HU, não sendo observadas na ausência desses polimorfismos.

## **SICKLE CELL DISEASE PHARMACOGENOMICS: IMPLICATIONS ON *SERPINA1* AND *MPO -463G>A* GENE POLYMORPHISMS AND HYDROXYUREA RESPONSE**

### **SHORT TITLE:**

Gene polymorphisms in SCD and HU treatment

### **AUTHORS:**

Thassila N. Pitanga<sup>a,b\*</sup>, Magda O. S. Carvalho<sup>a,c\*</sup>, André L. C. S. Souza<sup>a</sup>; Rayra P. Santiago<sup>a</sup>, Valma M. Lopes<sup>d</sup>, Ricardo R. Oliveira<sup>a</sup>, Marilda S. Gonçalves<sup>a,e</sup>.

### **AUTHOR AFFILIATIONS:**

<sup>a</sup>Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, FIOCRUZ/BA; <sup>b</sup>Instituto de Ciências da Saúde (ICS), Universidade Federal da Bahia (UFBA); <sup>c</sup>Hospital Universitário Professor Edgard Santos (HUPES), UFBA; <sup>d</sup>Fundação de Hematologia e Hemoterapia da Bahia (HEMOBA); <sup>e</sup>Faculdade de Farmácia, UFBA, Salvador, Bahia, Brazil. \*These authors contributed equally to this work.

### **CORRESPONDENT AUTHOR:**

Correspondence to Marilda S. Gonçalves, PhD, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, LHGB, Waldemar Falcão St, n. 121, Candeal, Salvador, Bahia, Brasil. Tel: +55 (71) 3176-2226, e-mail: mari@bahia.fiocruz.br

### **CONFLICT OF INTEREST:**

All authors have no conflict of interest to declare.

### **SOURCE FUNDING:**

This work was supported by grants from the Brazilian National Council of Research (CNPq) (311888/2013-5) (M.S.G.); the Foundation of Research and Extension of Bahia (FAPESB) (3626/2013, 1431040053063, and 9073/2007) (M.S.G.); and PPSUS/FAPESB (020/2013 EFP\_00007295), (M.S.G.); Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia do Sangue (CNPq) (Coordinated by S.T.O.S.), and MCD/CNPq/MS-SCTIE-DECIT (409800/2006-6), (M.S.G.). Sponsors of this study are public or nonprofit organizations that support science in general. They had no role in gathering analyzing, or interpreting the data.

## ABSTRACT

Background and Objective: *SERPINA1* and *myeloperoxidase (MPO)-463G>A* gene polymorphisms are associated with vascular complications in sickle cell disease (SCD). SCD patients are treated with Hydroxyurea (HU), which increases levels of fetal hemoglobin (HbF) and decreases leukocytes. We evaluated the association between these polymorphisms and clinical and laboratory aspects in response to HU treatment. **Methods:** Blood samples from 356 SCD patients and 100 healthy volunteers were analyzed. Sixty-nine patients were screened for *-463G>A MPO* and 129 for *SERPINA1* polymorphisms by RT-PCR-based methods. Laboratory tests were performed, and epidemiological and clinical data were collected. Results: In the general SCD patients, independent of gene polymorphisms, HU-treated individuals exhibit increased levels of serum ferritin and HbF and reduction of leukocytes count. The *MPO* polymorphism was associated with reduction in platelet and leukocytes counts. Under HU treatment, patients with *MPO* polymorphism showed increased levels of ferritin and HbF, whereas these parameters were not changed after treatment of patients without polymorphism. In contrast, SCD patients with *SERPINA1* polymorphism presented increased levels of ferritin and decreased levels of Alpha-1 antitrypsin (AAT). HU treatment significantly increased ferritin levels in both groups, whereas AAT were reduced only in the mutant group. HU-treated patients without *SERPINA1* polymorphism exhibit reduction in total leukocytes count and AAT levels. **Conclusion:** These results together point out that genetic change, such as mutations in *MPO* and *SERPINA1* genes, interfere with the response to HU treatment, and highlight the concern to better understand the influence of these polymorphisms in order to provide a more efficient therapy.

**Keywords:** Sickle Cell Disease; hydroxyurea; myeloperoxidase; *SERPINA1* gene; alpha-1 antitrypsin.

## INTRODUCTION

Sickle cell disease (SCD) is a general term used to determine a group of genetic disorders characterized by the predominance of hemoglobin S (HbS), such as sickle cell anemia (SCA), the double heterozygous association of HbS and HbC (HbSC) and interactions with thalassemia. The beta S ( $\beta^S$ ) allele is characterized by a single mutation (GAG > GTG) that occurs in the sixth codon of the beta globin gene (*HBB*), which valine replace glutamic acid in the sixth amino acid of the beta ( $\beta$ ) globin chain of the hemoglobin (Hb) molecule (STEINBERG, 2008; PITANGA et al., 2013). Clinically, SCD patients could be in a steady state, with no acute clinical manifestations, or in crisis, showing systemic inflammation related with vaso-occlusive phenomena and painful episodes, as well as susceptibility to infections (WEATHERALL, PROVAN, 2000; TAYLOR et al., 2008). This widely variability in the disease severity is usually associated with genotypic changes.

Myeloperoxidase (MPO) is an enzyme found in lysosomes of neutrophils and monocytes and its deficiency is associated with susceptibility to chronic inflammatory processes (COSTA et al., 2005; PROKOPOWICZ et al., 2012). The key feature of this enzyme is its ability to use hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ) and halides to generating their respective hypohalous acids (PROKOPOWICZ et al., 2012; PITANGA et al., 2014). A gene polymorphism in *MPO* promoter region (-463G>A) reduces MPO transcription and is associated with higher susceptibility to infection in SCD patients (COSTA et al., 2005; THUN et al., 2013; BARBOSA et al., 2014). Approximately 10% of the general population have the mutant allele A, of which about 35% are heterozygous (GA) and 65% are homozygous for the wild-type allele (GG) (DALLY et al., 2002; FEYLER et al., 2002; ZHONG et al., 2009). Individuals with the allele (GA

or AA) have MPO expression reduced almost three times when compared to the wild group. AA genotype corresponds to the most severe form of the polymorphism, resulting in lower serum levels and lower MPO activity (REYNOLDS et al., 2006).

Another protein associated with inflammation, which also exhibit genetic polymorphism, is the alpha-1-antitrypsin (AAT), which is secreted predominantly by hepatocytes and its levels are increased during inflammation or tissue injury. The AAT synthesis is controlled by the *SERPINA1* gene in the locus of protease inhibitor (Pi) on chromosome 14q32.1 in response to several cytokines such as interleukin-1 (IL-1), tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) and, especially, interleukin-6 (IL-6) (RICHARDS, GAULDIE, BAUMANN, 1991; LARD et al., 1999; LOMAS, MAHADEVA, 2002; RUDNICK, PERLMUTTER, 2005; CHAPPELL et al., 2006).

*SERPINA1* is highly polymorphic with over 125 SNPs (single nucleotide polymorphisms) and its variants are classified as "Pi" (proteases inhibitor). The presence of mutation is associated with reduction of AAT serum levels. The Z allele interferes in both activity and concentration of AAT, which is associated with more severity of the genetic alteration when compared to the wild type (allele M). On the other hand, the S allele affects levels of AAT, but has no implications on the enzyme activity. (TURINO et al., 1996; GOOPTU, DICKENS, LOMAS, 2014; STOCKLEY, TURNER, 2014). *SERPINA1* and *MPO -463G>A* gene polymorphisms could have a negative effect on inflammatory diseases, such as SCD, both in clinical and laboratory aspects and in the specific treatment of the disease.

Therapeutic alternatives that could be used for the treatment of SCD are bone marrow transplantation and hydroxyurea (HU) therapy. However, only the treatment with HU was approved by the Brazilian Ministry of Health since 2010 (BRASIL, 2010). The HU is an antineoplastic drug acting as an inhibitor of ribonucleotide reductase



enzyme, which leads to several beneficial effects, such as improvement in levels of fetal hemoglobin (HbF) and in the hydration of red blood cell (RBCs). Such molecular improvements are associated with reduction of vaso-occlusive crisis and painful events (DE MONTALEMBERT et al., 2006; PLATT, 2008).

The HU therapy has benefic effects when evaluating the entire population affected with SCD. However, is not clear if this treatment exhibits improvements in laboratory and clinical aspects in SCD patients with genetic polymorphisms. In this study we evaluated clinical, hematological and biochemical markers of SCD patients with *SERPINA1* and *MPO -463G>A* gene polymorphisms, as well as the effect of HU therapy in these patients.

## **MATERIAL AND METHODS**

### **Study Subjects**

A total of 355 SCD patients and 100 healthy volunteers were studied in this work. After obtaining approval from the Research Ethics Committee of the Oswaldo Cruz Foundation, we enrolled the patients from Fundação de Hematologia e Hemoterapia da Bahia (HEMOBA) and healthy volunteers (individuals without hematological disorder or inflammatory conditions) from of Pharmacy College of Universidade Federal da Bahia (UFBA). We performed a cross-sectional study composed of 235 SCA, 115 HbSC and 05 Hb<sup>S</sup>β<sup>0</sup> patients in steady-state, which were characterized by an absence of blood transfusion in a period of four month prior to blood sample. In addition, patients included in this study did not show any infection, hospitalization or vaso-occlusive event. The average age for the patients group and

the healthy volunteers group was  $14.0 \pm 9.0$  years (mean  $\pm$  standard deviation) and was  $8.0 \pm 3.0$  years respectively. Since there was statistical difference between the mean ages of patients and healthy volunteers, all analyzes were adjusted for age by linear regression. Sixty-nine patients were screened for the -463G>A *myeloperoxidase* gene polymorphism and 129 patients for the AAT gene polymorphism (*SERPINA1*). The average age of the patients and volunteers was  $14 \pm 9$  and  $8 \pm 3$ . The study was in accordance with Declaration of Helsinki of 1975 as revised in 2000, and all subjects (or their responsible) signed the informed consent form.

### **Blood collection**

Laboratory technicians collected a blood sample from each individual, using EDTA anticoagulant. Samples were refrigerated at 4°C for a maximum of six hours before the hemoglobin profile investigation.

### **Hemoglobin analysis**

Hematologic values were analyzed using an electronic counter ABX Pentra. The hemoglobin profile was confirmed by liquid chromatography high performance (HPLC), automated equipment (BioRad Variant<sup>®</sup>, California, USA).

### **Biochemical analyses**

Serum concentrations of biochemical and hematological markers were determined using automated equipment A25 (Biosystems S.A, Costa Brava, Barcelona); Access 2 and IMMAGE (Beckman Coulter, Inc., Fullerton, California, USA).

### ***MPO* -463G>A and *SERPINA1* gene polymorphisms**

The genomic DNA was extracted from peripheral blood of all studied patients, using the Flexigene DNA Kit (QIAGEN Inc., Valencia, CA, USA) in according to the manufacturer's recommendations and quantified by a spectrophotometer (NanoDrop® ND-1000, NanoDrop Technologies, Inc., Wilmington, NC, USA). *SERPINA1* gene variants were investigated by a duplex polymerase chain reaction (RT-PCR), using a combination of specific primers for the detection of the variant alleles PI\*M, PI\*S, and PI\*Z in a single reaction, followed by digestion of RFLP-PCR products by *TaqI* restriction enzyme (LUCOTTE, SESBOUE, 1999). The polymorphic site at position -463G>A of the *MPO* gene was investigated by RFLP-PCR, followed by digestion of RFLP-PCR products by *AccI* restriction enzyme (LONDON, LEHMAN, TAYLOR, 1997).

### **Hardy-Weinberg equilibrium**

We tested *MPO* polymorphism for Hardy-Weinberg Equilibrium (HWE) by on line program (<http://www.oege.org/software/hardy-weinberg.html>) (RODRIGUEZ, GAUNT, DAY, 2009). The locus is in HWE in the population when the relationship between allele frequencies and genotype proportions follows the equation

$p^2+2pq+q^2=1$ , where “p” and “q” are the frequencies for major and minor allele. *SERPINA1* polymorphism has multiple alleles, which do not allow HWE calculation.

### **Statistical analysis**

Differences between the means values of groups were compared using an unpaired t-test for data distributed normally and a Mann-Whitney test with Dunn for non-normal. The Kruskal–Wallis test or Anova with Turkey were used to compare means among two or more groups, as measured by interval variables. Genotypes distributions were also tested for HWE by the Chi-square ( $\chi^2$ ) test, where values of  $p>0.05$  were considered in HWE. Data analyses were performed using Prism 5.03 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) and STATA SE 10 software (StataCorp, Texas, USA). Values to  $p<0.05$  were considered a difference significant. All analyzes were adjusted for age by linear regression, because the difference between the mean ages of patients and healthy volunteers was statistical.

## **RESULTS**

### **Distribution frequencies of *MPO -463G>A* and *SERPINA1* gene polymorphisms in sickle cell disease patients**

*MPO -463G>A* and *SERPINA1* gene polymorphisms frequencies of the 198 patients and the 100 healthy volunteers were analyzed (Table 1). Sixty-nine patients and 100 healthy volunteers were screened for the *-463G>A* myeloperoxidase gene polymorphism. Among the patients and healthy volunteers, 43.5% and 53%

respectively had the wild genotype (GG). The heterozygote genotype (GA) was present in 44.9% of patient group and 41.0% of control group. The AA genotype was observed in the 11.6% of healthy individuals and 6% of patients. *MPO -463G>A* polymorphisms was in Hardy-Weinberg equilibrium both the patients ( $p=0.998$ ) and the healthy volunteers ( $p=0.599$ ) groups. For the *SERPINA1* gene polymorphism was studied 129 SCD patients and 100 healthy individuals. Of these, 91.4% and 92% respectively, had the wild genotype (MM). The SS genotype was observed only in 1.6% of patients with SCD, which was not observed in healthy volunteers group. The MS genotype was present in 7% in the patient group and 6% in the control group. Among the groups, the MZ genotype was observed only in the healthy individuals (2%).

### **Treatment with hydroxyurea is associated with hematological and biochemical markers changes**

Serum ferritin ( $522.4 \pm 830.1$ ) and fetal hemoglobin ( $9.3 \pm 6.7$ ) levels in HU-treated patients were higher than those observed in untreated individuals ( $272.5 \pm 361.4$   $p=0.002$ , and  $7.1 \pm 6.6$ ,  $p=0.006$ , respectively). However, the leukocyte count in the group not treated with HU ( $11651 \pm 12588$ ) was higher than that observed in the group of patients treated ( $9446 \pm 12136$ ,  $p=0.014$ ). Treatment with HU did not affect the other analyzed variables (Table 2).

### ***MPO -463G>A* and *SERPINA1* gene polymorphisms are related with hematological markers changes**

Platelet ( $361.1 \pm 137.1$ ), lymphocytes ( $3999 \pm 2036$ ) and leukocytes ( $10736 \pm 3735$ ) counts were significantly reduced in patients with MPO gene polymorphism (Figures 1d, 1e and 1f) when compared to the values found in the group of patients without the polymorphism ( $462.4 \pm 172.8$ ,  $p = 0.018$ ;  $5038 \pm 1888$ ,  $p = 0.009$ ;  $13294 \pm 3718$ ,  $p = 0.003$ ). The presence of polymorphisms did not affect the other variables analyzed in patients. Polymorphism did not affect other evaluated variables (Figures 1a, 1b, 1c, 1g). SCD patients that exhibit *SERPINA1* gene polymorphism are associated with serum ferritin and AAT change. It was found increased ferritin serum levels in patients with mutant genotype ( $359.8 \pm 154.8$ ) compared with wild group ( $242.5 \pm 230.2$ ,  $p = 0.0093$ ) (Figure 2a). However, the presence of the polymorphism is associated with reduction of AAT serum levels ( $149.4 \pm 16.0$ ) when compared to the wild group ( $172.1 \pm 38.1$ ,  $p = 0.016$ ) (Figure 2g). There was no statistical difference dependent on the polymorphism among the other variables in the group of patients (Figures 2b, 2c, 2d, 2e, 2f).

### ***MPO* -463G>A and *SERPINA1* gene polymorphisms interferes with the response to treatment with hydroxyurea**

Patients with mutant genotype for *MPO* treated with HU have increased ferritin serum levels ( $371.1 \pm 176.8$ ) when compared to untreated mutant group ( $179.1 \pm 167.0$ ,  $p = 0.007$ ) (Figure 3a). In the mutant group, HU treatment increases the HbF serum levels ( $8.1 \pm 4.1$ ) in relation to the untreated group ( $5.3 \pm 4.7$ ,  $p = 0.042$ ) (Figure 3c). There was no statistical difference in the ferritin and HbF serum levels in the wild group treated or not with HU (Figures 3a and 3c), suggesting that treatment effect on these variables only in the presence of the polymorphism. Treatment with HU did not

affect the other analyzed variables in mutants or wild groups (Figures 3b, 3d, 3e, 3f and 3g). In patients assessed for *SERPINA1* gene polymorphism, the HU treatment significantly increased ferritin serum levels in patients, both the mutant group ( $505.4 \pm 148.8$ ) as the wild group ( $256.4 \pm 160.7$ ) compared respectively, in polymorphism ( $265.0 \pm 85.7$ ,  $p=0.047$ ) and wild ( $220.0 \pm 231.4$ ,  $p=0.029$ ) groups untreated (Figure 4a). Serum levels of HbF significantly increased in the group without the mutation treated with HU ( $9.4 \pm 4.7$ ) when compared to the untreated group ( $6.4 \pm 4.9$ ,  $p=0.003$ ) (Figure 4b). Treatment did not affect this variable in the mutant group. Lymphocyte counts increased in the group of patients with polymorphism treated with HU ( $7417 \pm 2479$ ) compared to the untreated group ( $4079 \pm 1183$ ,  $p=0.016$ ) (Figure 4d). The treatment did not affect the group without the mutation. However, the leucocyte count was not affected by treatment in the mutant group. In patients without polymorphism, the number of leukocytes reduced in the group treated with HU ( $10384 \pm 4060$ ) in relation to the untreated group ( $12391 \pm 3611$ ,  $p=0.028$ ) (Figure 4F). Patients with the polymorphism and treated with HU exhibit AAT serum levels reduced ( $136.7 \pm 4.5$ ) when compared to the untreated group ( $154.7 \pm 17.4$ ,  $p=0.039$ ). Treatment with HU did not interfere with other variables (Figure 4c and 4e).

**No significant association between *MPO -463G>A* gene polymorphisms and clinical conditions of SCD patients.**

The analysis between wild and mutant genotype for *MPO* and *SERPINA1* are shown in Table 3 and Table 4 respectively. No significant association was observed between gene polymorphisms and clinical status of the patient, independent of adjusting for the confounding factors age, gender and HU in the multivariate analysis.

## DISCUSSION

In the present study, we observed a prevalence of 56% and 9% of *MPO* - 463G>A and *SERPINA1* gene polymorphisms respectively, within SCD patients. Although *MPO* or *SERPINA1* polymorphisms did not affected HbF levels, the treatment with HU showed better results for this parameter in patients with mutant allele to *MPO* or in wild group (GG) for *SERPINA1*.

The *MPO* polymorphism was in Hardy-Weinberg Equilibrium (HWE) in both SCD patients and healthy volunteers in this study. Besides that, there are studies showing lower frequency of *MPO* mutant genotype (GA and AA) in other inflammatory pathologies such as cystic fibrosis and end-stage renal disease, in spite of both studies has worked with populations in HWE (PECOITS-FILHO et al., 2003; REYNOLDS et al., 2006). This point out that the genotype frequency depends on the population studied as well as the population selection strategy used.

During crisis, SCD patients present severe clinical manifestations with systemic inflammation associated to vaso-occlusive phenomena and susceptibility to infections (WEATHERALL, PROVAN, 2000; TAYLOR et al., 2008). Since in wild type individuals *MPO* and *AAT* are associated with homeostasis maintenance, especially in host defense and inflammation, it is expected that the presence of polymorphism aggravate the clinical condition, as observed in other studies with other inflammatory diseases, such as gastric cancer, vasculitis, and systemic lupus erythematosus (REYNOLDS, STEGEMAN, TERVAERT, 2002; BOUALI et al., 2007; JIANG et al., 2012). However, we found no association between polymorphisms of *MPO* and *SERPINA1* and evaluated clinical manifestations in SCD patients. This observation



could also be explained by the reduced number of subjects carrying these polymorphisms and the low frequency of each evaluated clinical markers.

Regarding hematological and biochemical parameters it is well documented that platelets count, leucocytes count, (HbF, ferritin, and Hb are altered in SCD patients (STEINBERG, 2005; CARVALHO-NETO, LAND, FLEURY, 2011). However, this is the first documentation of the influence of *MPO* and *SERPINA1* gene polymorphisms in these laboratory parameters in this population. In all analyzes, these polymorphisms did not affect laboratory parameters of healthy volunteer, however, interfered in some markers of SCD patients.

The presence of mutant allele for *MPO* showed lower platelets, total leukocyte and lymphocyte counts than wide type group. It is observed that SCD patients' platelet express more adhesion molecules, which could contribute to vaso-occlusive phenomena and endothelial activation (BROWNE et al., 1996; PROENCA-FERREIRA et al., 2010; PROENCA-FERREIRA et al., 2014). In addition to platelets, leukocytes and other cells express high levels of adhesion molecules also contributing to vaso-occlusion in SCD (OKPALA, 2006). Therefore, considering the parameters "platelets", "lymphocytes" and "total leukocyte", *MPO* polymorphism could act as a protector factor for vaso-occlusive crisis, besides it was not showed here. These parameters, however, did not differ between wide type and mutant groups for *SERPINA1* polymorphism.

In contrast to *MPO* polymorphism analyses, *SERPINA1* polymorphism showed increased levels of ferritin, and, as expected, lower levels of AAT in the mutant group of SCD patients. Ferritin is inflammation biomarker and its levels are increased in vaso-occlusive crisis and infection (AL-SAQLADI, BIN-GADEEM, BRABIN, 2012). Therefore, this polymorphism could represent disease severity, especially because it

is associated with low levels of AAT, an anti-inflammatory enzyme (GOOPTU, DICKENS, LOMAS, 2014; STOCKLEY, TURNER, 2014). This highlights the need for looking more closely patients with these polymorphisms concerning specific treatment.

HU therapy has benefic effects in SCD patients, since it is a ribonucleotide reductase inhibitor, which increases levels of HbF, improves red cell rheology and reduces red cell adhesion (KUMKHAEK et al., 2008; PLATT, 2008). In this study, we showed that patients treated with HU, in general and independent of *MPO* or *SERPINA1* polymorphisms, had higher HbF levels. This data suggests that presence of polymorphism is not able to affect the drug activity regarding HbF improvement.

On the other hand, *MPO* polymorphism affected the response to treatment in regard to ferritin level, showing increased levels in those patients with mutation under treatment. Additionally, in the absence of mutation, HU did not interfere in the level of this inflammatory marker.

In this study, we showed evidence, for the first time, that polymorphism in two genes influence levels of hematological and biochemical markers, as well as in the response to HU treatment. Our results suggest that treatment of SCD patients should take into account other genetic disorders, such as polymorphisms, and should consider alternative therapy for specific situations. Since there is no safety alternative therapy for SCD, the major contribution of this study is to call attention for clinicians to monitor laboratorial parameters of SCD patients under HU treatment whom is known to have any other genetic disorder. We also suggest the development of new therapies to improve HbF levels through different pathway from what is used by HU and that do not affect other markers associated with inflammation.

## **AUTHORS' CONTRIBUTIONS**

TNP, RRO and MSG: conceived the study design. TNP: made the graphics and data analysis. RRO: Univariate and multivariate analysis and discussion of the results. MOSC: made all the samples collections and set up the database. ALCSS and RPS: performed both polymorphisms and discussion of results. VML: responsible for patients' follow-up. MSG was TNP supervisor during the whole work. TNP, RRO and MSG: wrote the paper. All authors read and approved the final manuscript.

## **ACKNOWLEDGEMENTS**

We are greatly grateful to SCD patients and all healthy volunteers for trust us and for making possible the realization of this work. We thank the laboratory technicians for help us in the collection of the samples. We would also like to thank Sânzio Santana and Caroline da Guarda for excellent discussions. TNP and MOSC received a scholarship from CAPES, RRO and MSG have productivity scholarship from CNPq.

## REFERENCES

1. Pitanga, TN, Vilas-Boas, W, Cerqueira, BA, Seixas, MO, Barbosa, CG, Adorno, EV, *et al.* Cytokine profiles in sickle cell anemia: Pathways to be unrevealed. *Adv Biosc Biotech.* 2013; **4**: p. 7.
2. Steinberg, MH. Sickle cell anemia, the first molecular disease: overview of molecular etiology, pathophysiology, and therapeutic approaches. *ScientificWorldJournal.* 2008; **8**: p. 1295-324.
3. Weatherall, DJ, Provan, AB. Red cells I: inherited anaemias. *Lancet.* 2000; **355**: p. 1169-75.
4. Taylor, JGt, Nolan, VG, Mendelsohn, L, Kato, GJ, Gladwin, MT, Steinberg, MH. Chronic hyper-hemolysis in sickle cell anemia: association of vascular complications and mortality with less frequent vasoocclusive pain. *PLoS One.* 2008; **3**: p. e2095.
5. Prokopowicz, Z, Marcinkiewicz, J, Katz, DR, Chain, BM. Neutrophil myeloperoxidase: soldier and statesman. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz).* 2012; **60**: p. 43-54.
6. Costa, RN, Conran, N, Albuquerque, DM, Soares, PH, Saad, ST, Costa, FF. Association of the G-463A myeloperoxidase polymorphism with infection in sickle cell anemia. *Haematologica.* 2005; **90**: p. 977-9.
7. Pitanga, TN, de Aragao Franca, L, Rocha, VC, Meirelles, T, Borges, VM, Goncalves, MS, *et al.* Neutrophil-derived microparticles induce myeloperoxidase-mediated damage of vascular endothelial cells. *BMC Cell Biol.* 2014; **15**: p. 21.
8. Thun, GA, Imboden, M, Ferrarotti, I, Kumar, A, Obeidat, M, Zorzetto, M, *et al.* Causal and synthetic associations of variants in the SERPINA gene cluster with alpha1-antitrypsin serum levels. *PLoS Genet.* 2013; **9**: p. e1003585.
9. Barbosa, LC, Miranda-Vilela, AL, Hiragi Cde, O, Ribeiro, IF, Daldegan, MB, Grisolia, CK, *et al.* Haptoglobin and myeloperoxidase (- G463A) gene polymorphisms in Brazilian sickle cell patients with and without secondary iron overload. *Blood Cells Mol Dis.* 2014; **52**: p. 95-107.
10. Dally, H, Gassner, K, Jager, B, Schmezer, P, Spiegelhalder, B, Edler, L, *et al.* Myeloperoxidase (MPO) genotype and lung cancer histologic types: the MPO -463 A allele is associated with reduced risk for small cell lung cancer in smokers. *Int J Cancer.* 2002; **102**: p. 530-5.
11. Feyler, A, Voho, A, Bouchardy, C, Kuokkanen, K, Dayer, P, Hirvonen, A, *et al.* Point: myeloperoxidase -463G --> a polymorphism and lung cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2002; **11**: p. 1550-4.
12. Zhong, C, Quanzhong, Y, Genshan, M, Hua, Z, Ruolong, Z, Jiahong, W, *et al.* Myeloperoxidase gene-463G > A polymorphism and premature coronary artery disease. *Genet Mol Biol.* 2009; **32**: p. 260-3.
13. Reynolds, WF, Sermet-Gaudelus, I, Gausson, V, Feuillet, MN, Bonnefont, JP, Lenoir, G, *et al.* Myeloperoxidase promoter polymorphism -463G is associated with more severe clinical expression of cystic fibrosis pulmonary disease. *Mediators Inflamm.* 2006; **2006**: p. 36735.
14. Richards, C, Gauldie, J, Baumann, H. Cytokine control of acute phase protein expression. *Eur Cytokine Netw.* 1991; **2**: p. 89-98.
15. Lomas, DA, Mahadeva, R. Alpha1-antitrypsin polymerization and the serpinopathies: pathobiology and prospects for therapy. *J Clin Invest.* 2002; **110**: p. 1585-90.
16. Chappell, S, Daly, L, Morgan, K, Guetta Baranes, T, Roca, J, Rabinovich, R, *et al.* Cryptic haplotypes of SERPINA1 confer susceptibility to chronic obstructive pulmonary disease. *Hum Mutat.* 2006; **27**: p. 103-9.
17. Lard, LR, Mul, FP, de Haas, M, Roos, D, Duits, AJ. Neutrophil activation in sickle cell disease. *J Leukoc Biol.* 1999; **66**: p. 411-5.
18. Rudnick, DA, Perlmutter, DH. Alpha-1-antitrypsin deficiency: a new paradigm for hepatocellular carcinoma in genetic liver disease. *Hepatology.* 2005; **42**: p. 514-21.
19. Gooptu, B, Dickens, JA, Lomas, DA. The molecular and cellular pathology of alpha(1)-antitrypsin deficiency. *Trends Mol Med.* 2014; **20**: p. 116-27.
20. Turino, GM, Barker, AF, Brantly, ML, Cohen, AB, Connelly, RP, Crystal, RG, *et al.* Clinical features of individuals with PI\*SZ phenotype of alpha 1-antitrypsin deficiency. alpha 1-Antitrypsin Deficiency Registry Study Group. *Am J Respir Crit Care Med.* 1996; **154**: p. 1718-25.

21. Stockley, RA, Turner, AM. alpha-1-Antitrypsin deficiency: clinical variability, assessment, and treatment. *Trends Mol Med*. 2014; **20**: p. 105-15.
22. BRASIL. Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas - Doença Falciforme. Ministério da Saúde. PORTARIA Nº 55. 2010.
23. de Montalembert, M, Brousse, V, Elie, C, Bernaudin, F, Shi, J, Landais, P. Long-term hydroxyurea treatment in children with sickle cell disease: tolerance and clinical outcomes. *Haematologica*. 2006; **91**: p. 125-8.
24. Platt, OS. Hydroxyurea for the treatment of sickle cell anemia. *N Engl J Med*. 2008; **358**: p. 1362-9.
25. Lucotte, G, Sesboue, R. Polymerase chain reaction detection of S and Z alpha-1-antitrypsin variants by duplex PCR assay. *Mol Cell Probes*. 1999; **13**: p. 389-91.
26. London, SJ, Lehman, TA, Taylor, JA. Myeloperoxidase genetic polymorphism and lung cancer risk. *Cancer Res*. 1997; **57**: p. 5001-3.
27. Rodriguez, S, Gaunt, TR, Day, IN. Hardy-Weinberg equilibrium testing of biological ascertainment for Mendelian randomization studies. *Am J Epidemiol*. 2009; **169**: p. 505-14.
28. Pecoits-Filho, R, Stenvinkel, P, Marchlewska, A, Heimbürger, O, Barany, P, Hoff, CM, *et al*. A functional variant of the myeloperoxidase gene is associated with cardiovascular disease in end-stage renal disease patients. *Kidney Int Suppl*. 2003: p. S172-6.
29. Bouali, H, Nietert, P, Nowling, TM, Pandey, J, Dooley, MA, Cooper, G, *et al*. Association of the G-463A myeloperoxidase gene polymorphism with renal disease in African Americans with systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol*. 2007; **34**: p. 2028-34.
30. Jiang, Z, Zhang, Z, Wang, Z, Zhang, G, Hu, K, He, B, *et al*. Association of the 463G-A myeloperoxidase gene polymorphism with gastric cancer risk. *Hepatogastroenterology*. 2012; **59**: p. 757-61.
31. Reynolds, WF, Stegeman, CA, Tervaert, JW. -463 G/A myeloperoxidase promoter polymorphism is associated with clinical manifestations and the course of disease in MPO-ANCA-associated vasculitis. *Clin Immunol*. 2002; **103**: p. 154-60.
32. Steinberg, MH. Predicting clinical severity in sickle cell anaemia. *Br J Haematol*. 2005; **129**: p. 465-81.
33. Carvalho-Neto, A, Land, M, Fleury, M. Clinical and laboratorial aspects in children with sickle cell disease. *RBAC*. 2011; **43**: p. 4.
34. Browne, PV, Mosher, DF, Steinberg, MH, Hebbel, RP. Disturbance of plasma and platelet thrombospondin levels in sickle cell disease. *Am J Hematol*. 1996; **51**: p. 296-301.
35. Proença-Ferreira, R, Brugnerotto, AF, Garrido, VT, Dominical, VM, Vital, DM, Ribeiro Mde, F, *et al*. Endothelial activation by platelets from sickle cell anemia patients. *PLoS One*. 2014; **9**: p. e89012.
36. Proença-Ferreira, R, Franco-Penteado, CF, Traina, F, Saad, ST, Costa, FF, Conran, N. Increased adhesive properties of platelets in sickle cell disease: roles for alphaIIb beta3-mediated ligand binding, diminished cAMP signalling and increased phosphodiesterase 3A activity. *Br J Haematol*. 2010; **149**: p. 280-8.
37. Okpala, I. Leukocyte adhesion and the pathophysiology of sickle cell disease. *Curr Opin Hematol*. 2006; **13**: p. 40-4.
38. Al-Saqladi, AW, Bin-Gadeem, HA, Brabin, BJ. Utility of plasma transferrin receptor, ferritin and inflammatory markers in children with sickle cell disease. *Paediatr Int Child Health*. 2012; **32**: p. 27-34.
39. Kumkhaek, C, Taylor, JGt, Zhu, J, Hoppe, C, Kato, GJ, Rodgers, GP. Fetal haemoglobin response to hydroxycarbamide treatment and sar1a promoter polymorphisms in sickle cell anaemia. *Br J Haematol*. 2008; **141**: p. 254-9.

## FIGURE LEGENDS

### Figure 1

Ferritin (a), Hemoglobin (b) Fetal Hemoglobin (c), Platelet (d), Lymphocytes (e), Total Leukocytes (f) and Alpha-1 antitrypsin (g) levels in Sickle Cell Disease (SCD; n=69) patients and Healthy Volunteers (n=100), according to the presence of *-463G>A myeloperoxidase* gene polymorphism. Wt, Wild Type; Mut, Mutant.

### Figure 2

Ferritin (a), Hemoglobin (b) Fetal Hemoglobin (c), Platelet (d), Lymphocytes (e), Total Leukocytes (f) and Alpha-1 antitrypsin (g) levels in Sickle Cell Disease (SCD; n=129) patients and Healthy Volunteers (n=100), according to the presence of *SERPINA1* gene polymorphism. Wt, Wild Type; Mut, Mutant.

### Figure 3

Ferritin (a), Hemoglobin (b) Fetal Hemoglobin (c), Platelet (d), Lymphocytes (e), Total Leukocytes (f) and Alpha-1 antitrypsin (g) levels in Sickle Cell Disease (SCD; n=69) patients, according to the presence of *-463G>A myeloperoxidase* gene polymorphism and hydroxyurea treatment. Wt, Wild Type; Mut, Mutant.

### Figure 4

Ferritin (a), Hemoglobin (b) Fetal Hemoglobin (c), Platelet (d), Lymphocytes (e), Total Leukocytes (f) and Alpha-1 antitrypsin (g) levels in Sickle Cell Disease (SCD; n=129) patients, according to the presence of *SERPINA1* and gene polymorphism and hydroxyurea treatment. Wt, Wild Type; Mut, Mutant.

Figure 1

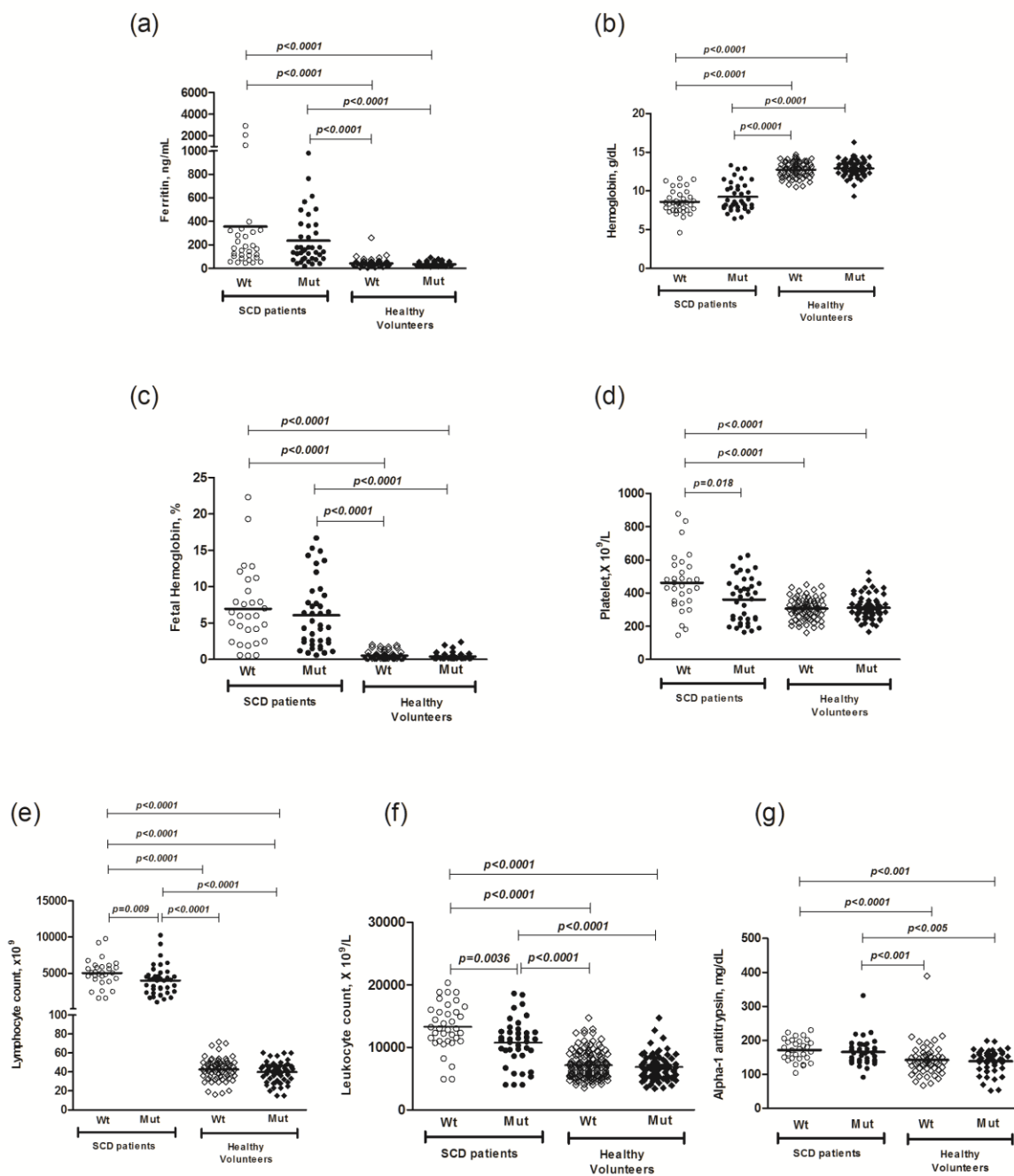


Figure 2

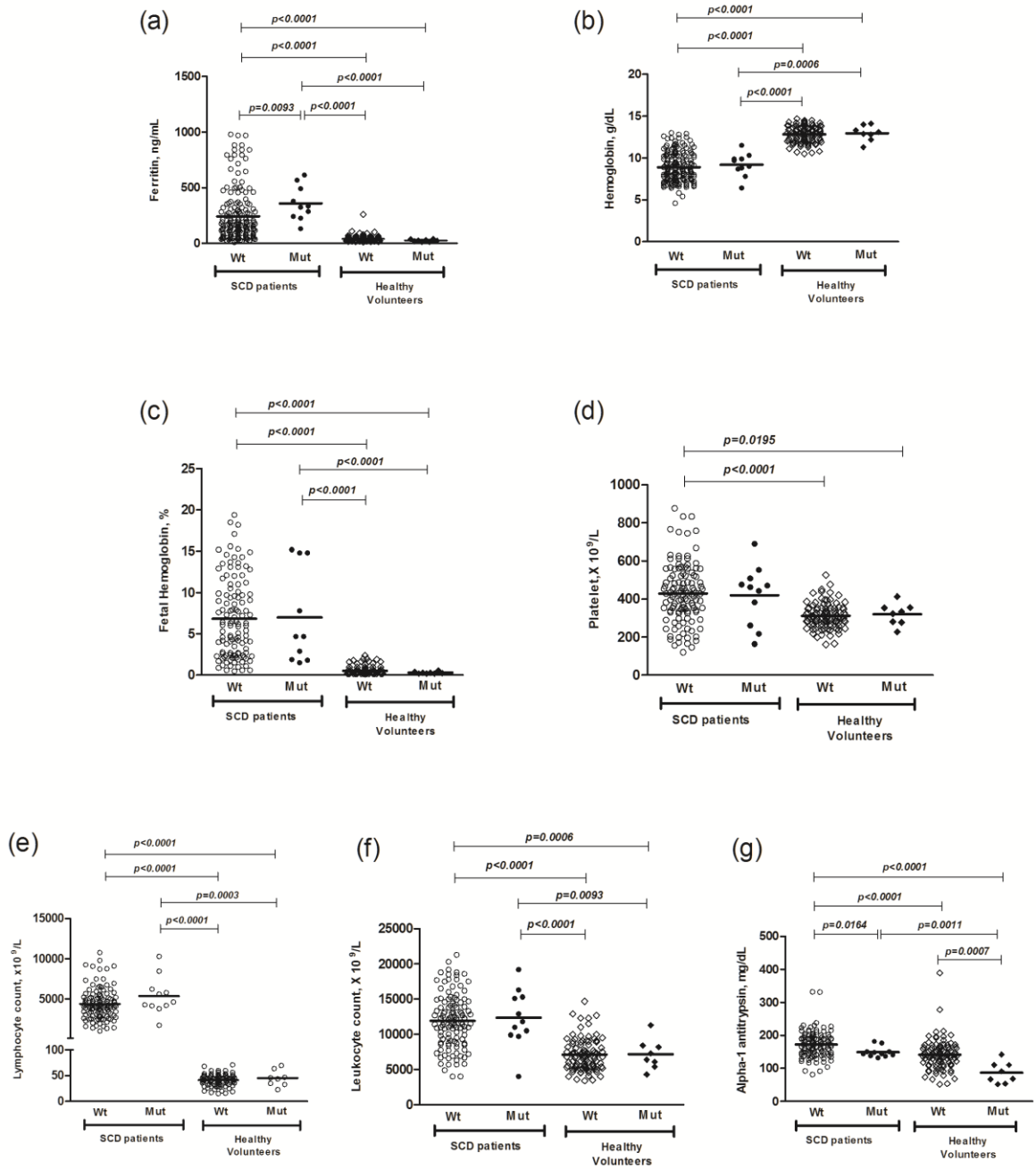




Figure 3

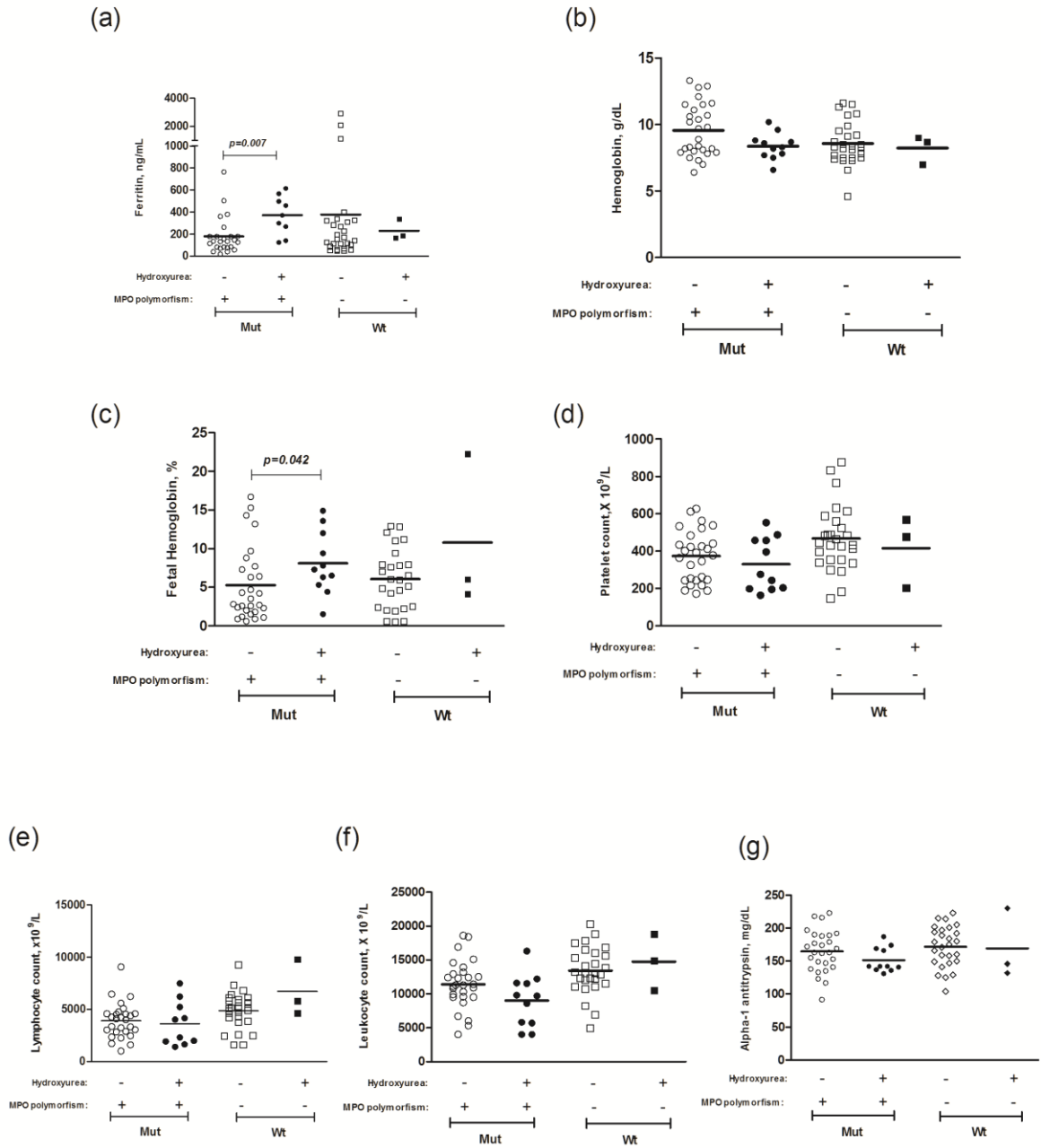
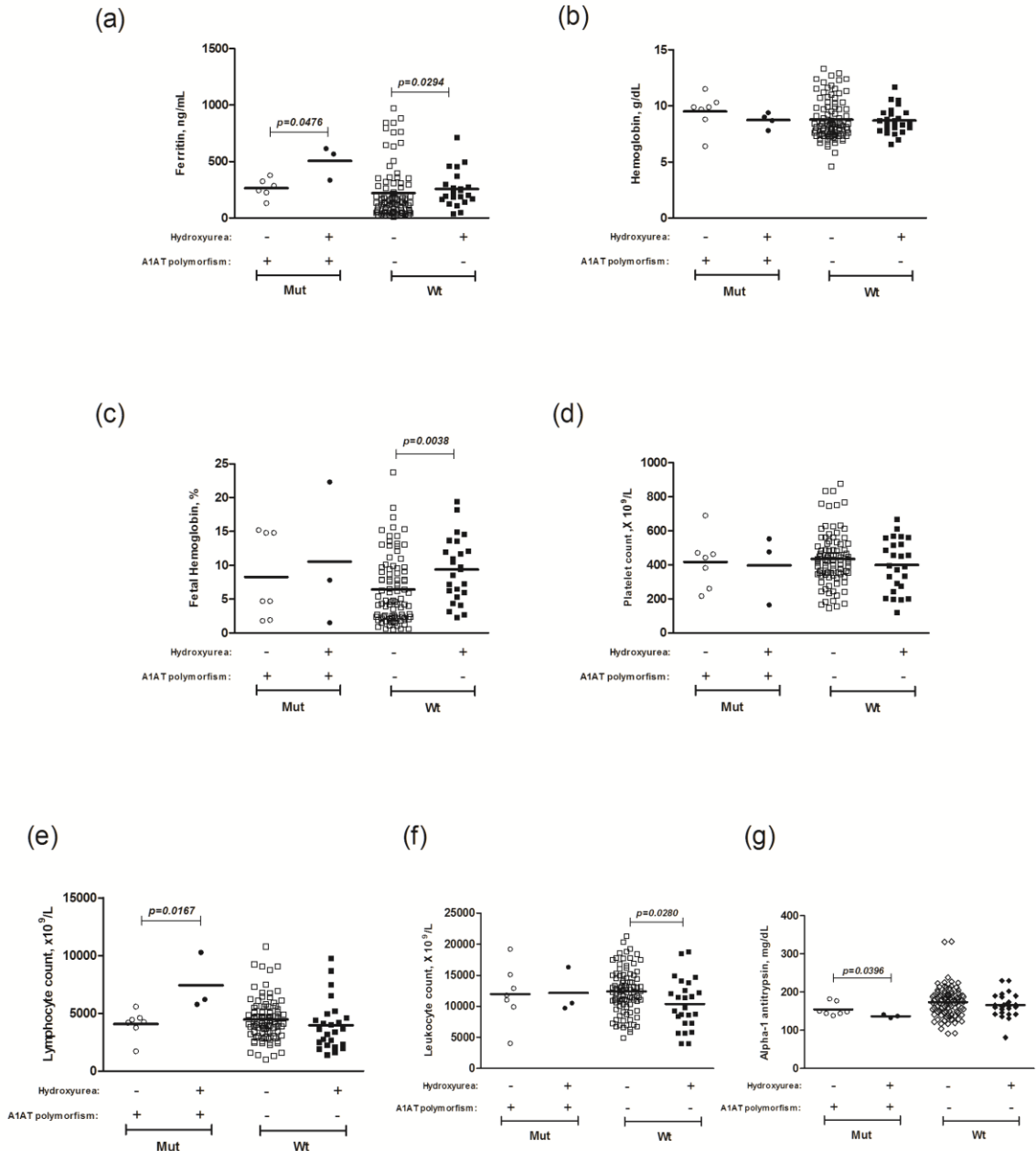


Figure 4



**Table 1** Frequencies of *MPO* -463G>A and *SERPINA1* gene polymorphisms in SCD patients group compared with the healthy volunteers.

Genotype		Genotype frequency n (%)		p value*
		SCD	Healthy volunteers	
<i>MPO</i> -463G>A	GG	30 (43.5)	53 (53.0)	0,304
	GA	31 (44.9)	41 (41.0)	
	AA	8 (11.6)	6 (6.0)	
<b>Total</b>		<b>69</b>	<b>100</b>	
<i>SERPINA1</i>	MM	118 (91.4)	92 (92.0)	--
	MZ	-	2 (2.0)	
	MS	9 (7.0)	6 (6.0)	
	SS	2 (1.6)	-	
	ZZ	-	-	
<b>Total</b>		<b>129</b>	<b>100</b>	

The genotypic and allelic distributions in patients and healthy volunteers of *MPO* -463G>A gene polymorphisms was in HWE ( $p=0.998$  and  $p=0.599$ , respectively) *SERPINA1* polymorphism has multiple alleles which prevents the calculation of HWE. SCD, sickle cell disease; HWE, Hardy–Weinberg equilibrium; \* Chi-square ( $\chi^2$ ) test.

**Table 2** Steady state hematological and biochemical markers values of the SCD patients treated or untreated with HU.

	<b>HU-Untreated</b> (Mean $\pm$ SD) (n=288)	<b>HU-Treated</b> (Mean $\pm$ SD) (n=54)	<i>p</i> value*
Ferritin (ng/mL)	272.5 $\pm$ 361.4	522.4 $\pm$ 830.1	<b>0.002</b>
Alpha-1 antitrypsin (mg/dL)	158.1 $\pm$ 42.3	158.4 $\pm$ 36.3	0.953
Hemoglobin (g/dL)	9.4 $\pm$ 1.9	9.1 $\pm$ 1.6	0.478
Fetal Hemoglobin (%)	7.1 $\pm$ 6.6	9.3 $\pm$ 6.7	<b>0.006</b>
Platelets ( $\times 10^9$ /mL)	407.1 $\pm$ 154.5	387.5 $\pm$ 161.9	0.496
Lymphocytes ( $\times 10^9$ /mL)	4313 $\pm$ 1992	4329 $\pm$ 2353	0.565
Leukocyte ( $\times 10^9$ /mL)	11651 $\pm$ 12588	9446 $\pm$ 12136	<b>0.014</b>

SCD, sickle cell disease; HU, hydroxyurea; SD, standard deviation;

\*Mann-Whitney test; values to  $p < 0.05$  were considered a difference significant

**Table 3** Univariate and multivariate analysis of the association between *MPO* -463G>A gene polymorphism and clinical manifestations in SCD patients.

	Wide Type (GG) n=30 [n(%)]	Mutant (GA or AA) n=39 [n(%)]	Univariate analysis OR (95% CI)	P	Multivariate analysis OR (95% CI)	p*
Pneumonia	16 (55.2)	22 (57.9)	1.12 (0.42-2.96)	0.824	0.88 (0.36-4.98)	0.821
Fever	2 (14.3)	10 (45.4)	5.00 (0.90-27.81)	0.066	4.54 (0.67-30.65)	0.121
Splenomegaly	14 (46.7)	18 (46.2)	0.98 (0.38-2.54)	0.966	0.87 (0.31-2.44)	0.786
Splenic sequestration	5 (16.7)	5 (12.8)	0.74 (0.19-2.82)	0.654	0.40 (0.08-2.01)	0.265
Stroke	2 (6.7)	3 (7.7)	1.17 (0.18-7.47)	0.871	0.59 (0.08-4.58)	0.616
Painful crisis	28 (93.3)	38 (97.4)	2.71 (0.23-31.44)	0.424	0.36 (0.01-9.41)	0.538
Vaso-occlusive crisis	28 (93.3)	38 (97.4)	2.71 (0.23-31.44)	0.424	0.36 (0.01-9.41)	0.538
Infection	14 (46.7)	28 (71.8)	2.74 (0.99-7.57)	0.051	2.51 (0.85-7.40)	0.096
Acute chest syndrome	1 (3.3)	2 (5.1)	1.57 (0.14-18.15)	0.719	0.84 (0.05-15.29)	0.908
Transfusion	17 (56.7)	25 (64.1)	1.37 (0.52-3.62)	0.531	0.96 (0.32-2.83)	0.937

\*Multivariate analysis adjusted by age, gender and Hydroxyurea therapy; OR, Odds Ratio.

**Table 4** Univariate and multivariate analysis of the association between SERPINA1 gene polymorphism and clinical manifestations in SCD patients.

	Wide Type (MM) n=118 [n (%)]	Mutante (MZ, MS, SZ or SS) n=11 [n(%)]	Univariate analysis OR (95% CI)	p	Multivariate analysis OR (95% CI)	P*
Pneumonia	66 (57.9)	5 (50.0)	0.73 (0.20-2.65)	0.630	0.79 (0.21-2.93)	0.724
Fever	21 (35.0)	1 (20.0)	0.46 (0.05-4.43)	0.505	0.43( 0.04-4.74)	0.494
Splenomegaly	49 (42.6)	3 (30.0)	0.58 (0.14-2.35)	0.442	0.65 (0.16-2.74)	0.559
Splenic sequestration	14 (12.4)	2 (20.0)	1.77 (0.34-9.18)	0.498	2.40 (0.39-14.83)	0.345
Stroke	8 (7.0)	1 (10.0)	1.49 (0.17-13.24)	0.723	1.32 (0.14-12.40)	0.806
Painful crisis	109 (94.8)	10 (100)	-	-	-	-
Vaso-occlusive crisis	109 (94.8)	10 (100)	-	-	-	-
Infection	76 (66.1)	4 (40.0)	0.34 (0.09-1.28)	0.112	0.32 (0.08-1.29)	0.109
Acute chest syndrome	10( 8.7)	0 (0)	-	-	-	-
Transfusion	79 (68.7)	5 (50.0)	0.46 (0.12-1.67)	0.236	0.43 (0.11-1.71)	0.230

\*Multivariate analysis adjusted by age, gender and hydroxyurea; OR, Odds Ratio.

## 6.2 Manuscrito 2

**Título:** Sickle Red Cells as Danger Signals for Toll-Like Receptors Gene Expression: Is Hydroxyurea Beneficial?

**Autores:** Pitanga, T.N.; Oliveira, R.R; Zanette, D.L.; Guarda, C.C.; Santiago, R.P; Santana, S.S; Lopes, M.V.; Lima, J.B.; Carvalho, G.Q.; Carvalho, M.O.S.; Maffili, V.V.; Alcântara, L.C.J.; Borges, V.M.; Goncalves, M.S.

**Situação:** A ser submetido

**Objetivos:** *(referentes aos objetivos 2 a 4 da tese)*

1. Determinar a expressão de genes relacionados aos receptores do tipo Toll células mononucleares (PBMC) de pacientes com anemia falciforme e de voluntários sadios;
2. Avaliar o efeito da adição de hemácias falcizadas na expressão de genes relacionados aos receptores do tipo Toll em cultura de PBMC de voluntários sadios, tratada ou não com hidroxureia;
3. Avaliar moléculas inflamatórias (LTB4 e nitrito) em sobrenadante de cultura de células mononucleares incubadas com hemácias falcizadas, lisadas ou íntegras, tratadas ou não com hidroxureia.

**Principais resultados:** Células mononucleares (PBMC) de pacientes com AF apresentam expressão aumentada de receptores tipo Toll (TLR) 2, TLR4 e TLR5 e hemácias AF induzem expressão gênica de TLR9 em PBMC de voluntários sadios e aumentam secreção de leucotrieno B4. O tratamento com hidroxureia aumenta a expressão de TLR2 e reduz produção de nitrito em PBMC de voluntários sadios tratados com hemácias AF.

## **Sickle Red Cells as Danger Signals for Toll-Like Receptors Gene Expression: Is Hydroxyurea Beneficial?**

### **AUTHORS**

Thassila Nogueira Pitanga,<sup>1,2</sup> Ricardo Riccio Oliveira,<sup>1</sup> Dalila Lucíola Zanette,<sup>1</sup> Caroline Conceição da Guarda,<sup>1</sup> Rayra Pereira Santiago,<sup>1</sup> Sânzio Silva Santana,<sup>1</sup> Valma M. Lopes do Nascimento,<sup>3</sup> Jonilson Berlink Lima,<sup>1</sup> Grazielle Quintela de Carvalho,<sup>1</sup> Magda O. S. Carvalho,<sup>4</sup> Vitor Valério Maffili,<sup>1</sup> Luiz Carlos Júnior Alcântara,<sup>1</sup> Valéria Matos Borges<sup>1</sup> and Marilda de Souza Gonçalves<sup>1,5</sup>

### **AUTHOR AFFILIATIONS**

<sup>1</sup>Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz – FIOCRUZ/BA; <sup>2</sup>Instituto de Ciências da Saúde (ICS), Universidade Federal da Bahia (UFBA); <sup>3</sup>Fundação de Hematologia e Hemoterapia da Bahia (HEMOBA); <sup>4</sup>Hospital Universitário Professor Edgard Santos (HUPES), UFBA; <sup>5</sup>Faculdade de Farmácia, UFBA, Salvador, Bahia, Brazil.

**RUNNING TITLE:** Sickle cell disease drives Toll signaling

**CORRESPONDENCE:** Marilda S. Gonçalves, PhD, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, LHGB, Waldemar Falcão St, n. 121, Candeal, Salvador, Bahia, Brasil. Tel: +55 (71) 3176-2226, e-mail: mari@bahia.fiocruz.br

**CONFLICT OF INTEREST:** All authors declare no conflicts of interest.

**FUNDING:** This work was approved by the Research Ethics Committee (CAAE: 04733612.7.0000.0040) and was supported by grants from the Brazilian National Council of Research (CNPq) (311888/2013-5) (M.S.G.); the Foundation of Research and Extension of Bahia (FAPESB) (3626/2013, 1431040053063, and 9073/2007) (M.S.G.); and PPSUS/FAPESB (020/2013 EFP\_00007295), (M.S.G.); the Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia do Sangue (CNPq) (Coordinated by S.T.O.S.), and MCD/CNPq/MS-SCTIE-DECIT (409800/2006-6), (M.S.G.). Sponsors of this study are public or nonprofit organizations that support science in general. They had no role in gathering analyzing, or interpreting the data.



## Summary

Sickle Cell Anemia (SCA) is an inflammatory condition associated with vaso-occlusive episodes and intravascular hemolysis. We evaluated expression of TLR2, TLR4, TLR5 and TLR9 in peripheral blood mononuclear cells (PBMC) of SCA patients, and the role that erythrocytes play in the expression of these TLRs in the presence of Hydroxyurea (HU). PBMC of healthy donors were challenged with red blood cells of SCA patients (SS-RBC) or healthy volunteers (AA-RBC) in presence of HU. We demonstrated that TLR2, TLR4 and TLR5 are highly expressed in PBMC of SCA patients, whereas TLR9 expression was similar to control group. Additionally, intact or lysed SS-RBC, but not AA-RBC, induces TLR9 expression, and lysed, both AA- and SS-RBC, induces expression of TLR2, TLR4 and TLR5. Interestingly, HU treatment increases expression of TLR2 and does not affect expression of other TLRs. Moreover, although SS-RBC induces LTB4 and nitrite production, HU does not prevent LTB4 but inhibits nitrite production. These data reinforce that RBCs, especially SS-RBCs, act as danger signals, stimulating TLR expression and contributing to inflammation. This study highlighted that HU does not prevent TLR-dependent inflammation, pointing out the need to develop new drugs that act with different mechanisms of action of those observed for HU.

**Keywords:** Sickle cell disease, Hydroxyurea, Toll-like receptors, Leukotriene B4, Nitric oxide.

## Introduction

Sickle Cell Anemia (SCA) is a genetic disorder characterized by the presence of homozygous hemoglobin S (HbS). Clinically, SCA patients could be in a steady state, with no clinical manifestations, or in crisis, showing systemic inflammation coinciding with vaso-occlusive phenomena and painful episodes, as well as susceptibility to infections and intravascular hemolysis (PLATT, 2000; WEATHERALL, PROVAN, 2000; TAYLOR et al., 2008; CONNES et al., 2014). This disease has been characterized as a chronic inflammatory state, coinciding with abnormal activation and elevated number of peripheral blood mononuclear cells (PBMCs), endothelial dysfunction and an increased level of multiple inflammatory mediators (ZENNADI et al., 2008; VILAS-BOAS et al., 2010; CERQUEIRA et al., 2011; PITANGA et al., 2013).

Endothelial cells, leukocytes and platelets are constantly exposed to toxic products of sickle red cell, specially the heme group, released during intravascular hemolysis, which are frequently observed in SCA patients, and leads to systemic inflammation and pro-thrombotic phenomena (BELCHER et al., 2003; WOOD, HEBBEL, GRANGER, 2004). This condition is associated with increased levels of nitric oxide (NO) metabolites and leukotriene (LT) B<sub>4</sub> even in steady state, which is worsened during vaso-occlusion episodes (IBE et al., 1994; SETTY, STUART, 2002; GLADWIN, KATO, 2005). Free heme reacts with NO, an important molecule involved in vascular tone and the maintenance of vascular homeostasis, to form its metabolites (nitrite and nitrate), thereby reducing its bioavailability. Moreover, heme induces LT production, an inflammatory mediator derived from arachidonic acid metabolism, which induces leucocytes migration and activation (GRACA-SOUZA et al., 2002; EBERHARDT et al., 2003; MONTEIRO et al., 2011; RAAT et al., 2013).

It has been proposed that sickle red blood cells (SS-RBC) could act as an inflammation inducer agent, stimulating production of LT and thromboxane A<sub>2</sub>, resulting in both hemolysis and vaso-occlusive episodes. SS-RBC exhibit abnormal adhesion to extracellular matrix proteins, such as thrombospondin, which increases pain episodes in SCA patients (STEINBERG, BRUGNARA, 2003; TELEN, 2005; CHAAR et al., 2010; OPENE et al., 2014). Since the presence of sickle red cell is a typical feature in sickle cell disease (SCD) patients, more investigation is necessary

in order to identify its role in the amplification and maintenance of inflammatory immune response within these conditions.

The immune response, particularly the innate immune response through innate receptors, such as NOD-like (NLR) and Toll-like receptors (TLR), plays important role in the initiation and maintenance of the inflammatory process observed in SCA patients. Since TLRs are a family of evolutionary conserved proteins that recognize pathogen- (PAMPs) and danger- (DAMPs) associated molecular patterns, it is expected that TLR plays a critical role in SCA patients (BAHL et al., 2011; BELCHER et al., 2014; GUPTA, 2014; XU et al., 2014; VICARI et al., 2015).

In humans, ten TLRs (TLR1 to TLR10) were reported, each of which has certain specificity for a particular PAMP or DAMP. Several studies have shown association between expression of these receptors and inflammatory conditions. In SCD, for instance, TLR4 expression is 100 fold higher in patients compared to healthy controls, and the mortality and inflammatory condition is directly associated with high intracellular iron (VAN BEERS et al., 2015). TLR4 is a receptor that recognizes one of the most well-known PAMP, the lipopolysaccharide (LPS). However, TLR4 and other TLRs were recently shown to recognize cellular residues and other endogenous molecules, acting as signals for tissue injury. Heat shock protein (HSP), high-mobility group protein B1 (HMGB1), oxidized low-density lipoprotein (oxLDL) and heme are DAMPs considered as TLR4 agonists (IMAI et al., 2008; LEFEBVRE et al., 2011; BELCHER et al., 2014; GUPTA, 2014; YANG et al., 2014).

Although TLR4 is the best well characterized TLR in SCD, other TLRs may play a role in the immunopathogenesis of the disease, contributing to its severity and therapeutic failure. In Brazil, hydroxyurea (HU) is the drug approved for treatment of SCA patients. HU is a cytotoxic agent that inhibits ribonucleotide reductase enzyme and leads to improvement in levels of fetal hemoglobin (HbF), in the hydration of RBC and reduces SS-RBCs-endothelial interaction (PLATT, 2008; STEINBERG et al., 2010; SHETH, LICURSI, BHATIA, 2013). Such effects are associated with improvement of clinical status of the patient and reduction of inflammatory markers (DE MONTALEMBERT et al., 2006; PLATT, 2008). However, it is not known whether HU interferes with TLR signaling pathways.

The role that inflammatory receptors, such as TLRs play in the immunopathogenesis of SCA, as well as the contribution of RBC from SCA patients

to the induction of inflammation and the ability of HU to revert this scenario, are still not clear. In this study, we evaluated the expression of TLR2, TLR4, TLR5 and TLR9 in PBMC of SCA patients. Moreover, we tested the role that RBC obtained from SCA patients play in the expression of these TLRs in PMBC from healthy donors, as well as the *in vitro* effect of hydroxyurea in the expression of these inflammatory markers.

## **Material and methods**

### **Study subjects**

A cross sectional study was performed to include 12 sickle cell anemia (SCA) patients (age  $9.1 \pm 4.7$  years), recruited at the Hematology and Hemotherapy Foundation of the State of Bahia (HEMOBA). All patients were in steady-state, characterized by absence of blood transfusion in a period of four months prior to blood draw. In addition, patients included in this study did not show any infection, hospitalization or vaso-occlusive event, and were not under antibiotics, corticosteroids or hydroxyurea treatments, but all patients were under treatment with folic acid. The control group consisted of nine healthy volunteers (age  $12.4 \pm 5.6$  years) recruited at the Pharmacy College (FacFAR) of Federal University of Bahia of Bahia (UFBA). This group was characterized by absence of hematological disorders or inflammatory conditions. This study was approved by the Research Ethics Committee of the Oswaldo Cruz Foundation, and was developed in accordance with the Declaration of Helsinki of 1975 as revised in 2000. All subjects (or their parents/legal guardians) agreed to participate after reading the terms in the informed consent.

### **Blood samples and preparation of red blood cells**

Venous blood was collected from patients and controls using the anticoagulant ethylene-diamine-tetraacetic-acid (EDTA) in order to determine hemoglobin profile, and to obtain red blood cells (RBC) and peripheral blood mononuclear cells (PBMC). Additionally, all PBMCs used for cell culture (PBMC culture) experiments were obtained from fresh leukocytes concentrates (buffy coat) of healthy blood donors of HEMOBA. The buffy-coat samples were serological tested and negative for HIV, Human T lymphotropic virus type 1 (HTLV), hepatitis B (HBV), hepatitis C (HCV), syphilis and Chagas disease.

In order to obtain RBC, each blood sample was centrifuged at 270 g for 10 min to discard the platelet-rich plasma (PRP). Leukocytes and PRP were removed by aspiration, and RBC were washed 3 times in sterile PBS (pH 7.3). RBC concentrate were assessed for leukocyte and platelet contamination by staining with trypan blue and then analyzed by using a phase contrast microscope (Olympus CK2, Center Valley, PA, USA). For the experiments with lysed erythrocytes, 500 $\mu$ L of RBC concentrate was kept at -70°C for 3 hours and subsequently thawed to obtain lysed RBC (BENSOUDA, LAATIRIS, 2006). The purity of erythrocyte lysis (> 90%) was evaluated by microscopic examination of cells stained with trypan blue.

### **Hematological and biochemical analysis performed**

Hematological and biochemical parameters from patients and controls included in this studied was analyzed. RBC, platelets, leucocyte, reticulocyte, hemoglobin, fetal hemoglobin, hematocrit, ferritin and C-reactive protein of the SCA patients and controls are shown in Table 1. The mean age between patients and healthy volunteers was similar.

Hematologic values and RBC indices were determined by using the electronic counter ABX Pentra and morphological analysis of red blood cells was performed by microscopic examination of blood smears stained with Wright. The hemoglobin profile was confirmed by high-performance liquid chromatography (HPLC) in automated equipment (Variant I - Bio-rad). Reticulocyte counts were determined using supravital staining. Biochemical analyzes were determined by automated method and included the C-reactive protein. These analyses were performed using A25 equipment (AS Biosystems, Barcelona, Spain) at the Laboratory of Biochemistry, Faculty of Pharmacy, Federal University of Bahia.

### **Peripheral blood mononuclear cells separation**

Mononuclear cells were obtained from peripheral blood of healthy volunteers and SCA patients and buffy coat bags of healthy blood donors. Initially, whole blood was centrifuged at 270 g for 10 min to discard the platelet-rich plasma. The leukocyte concentrate was diluted in 0.9% saline solution buffered with phosphate (PBS) and centrifuged on Ficoll-Hypaque (GE Healthcare Bio-Sciences Corp. Piscataway, NJ, USA) 500 g for 30 minutes at 25°C. The mononuclear cells ring was then centrifuged at 500 g for 10 minutes. Pellet was collected and resuspended in RPMI-1640 medium

(Grand Island, NY, USA) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) (Sigma-Aldrich, Piscataway, USA) and with 100 U/ml penicillin and 100 µg/ml streptomycin (Grand Island, NY, USA).

PBMC from buffy coat bags were counted, distributed in 24-well plate (Costar, Corning, NY, USA) at a concentration of  $3 \times 10^6$  mononuclear cells/mL and cultured with 3% lysed or intact RBC for 24h at 37°C and 5% CO<sub>2</sub> cultivated with or without 100 µM hydroxyurea (HU) (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA) (STEINBERG et al., 2010).

### **Expression of mRNA for TLR2, TLR4, TLR5 and TLR9**

Total mRNA extraction from PBMC was performed using Trizol Reagent (Invitrogen, Life Technologies, CA, USA) according to the manufacturer's instructions and measured by NanoDrop™ Lite Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, USA). Reverse transcription was performed with 400 ng of total RNA using the High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems TM, Foster City, CA) according to the manufacturer's instructions. The conditions used were 25°C for 10 minutes, 37°C for 120 minutes and 85°C for 5 minutes.

Gene expression analysis was performed by quantitative real-time PCR (qPCR) on an ABI 7500 FAST Real-Time PCR equipment (Applied Biosystems™, Foster City, CA) for TLR2, TLR4, TLR5, TLR9, GAPDH and β-ACTIN genes with Power SYBR® Green, according to the manufacturer's instructions. The standard qPCR conditions were as follows: 10 min at 95°C, followed 40 cycles at 95°C for 15 sec, 60°C for 60 sec. Primers used for qPCR reactions are shown in Table 2. After amplification and dissociation curve runs, the values of threshold cycle (Ct) were obtained by using the Operational Programme 7500™ System (Applied Biosystems, USA). The intra-assay precision was calculated using the equation  $E = (-1/\text{slope})$  to confirm precision and reproducibility of qPCR. The expression levels were normalized based on the geometric mean of GAPDH and β-ACTIN (endogenous controls). Relative expression folds were calculated based on 2<sup>-ddCt</sup> method (PFAFFL, 2001).

### **Quantification of leukotriene-B4 and nitrite production in culture supernatants**

PBMC from buffy coat bags was cultured with 3% of lysed or intact RBC for 24h at 37°C and 5% CO<sub>2</sub>, in the presence or absence of 100 µM hydroxyurea.

Supernatants were collected and used for the detection of leukotriene-B4 (LTB4) by EIA in accordance with the manufacturer's instructions (Cayman Chemical Company, MI, USA). NO production was assessed in culture supernatants by determining nitrite accumulation, using the Griess method (DING, NATHAN, STUEHR, 1988).

### **Statistical analysis**

Average values of quantitative variables between groups were compared using the Student's t test for unpaired data with normal distribution and the Mann-Whitney test for non-normally distributed data. Kruskal-Wallis test was used for comparison tests between two or more groups, non-parametric quantitative variables. Values of  $p < 0.05$  were considered a significant difference. All data were analyzed using Prism 5.1 software (GraphPad, San Diego, USA).

## **Results**

### **TLR2, TLR4 and TLR5 are highly expressed in PBMC of SCA patients**

SCA is an inflammatory condition in which the innate immune response may play an important role, both in initiating and maintaining the pathological response. For this reason, we first examined whether the expression of TLR2, TLR4, TLR5 and TLR9, assessed by qPCR, differed between peripheral blood mononuclear cells obtained from SCA patients (SS-PBMC) and healthy controls (AA-PBMC).

Expression of TLR2, TLR4 and TLR5 was significantly higher in SS-PBMC ( $0.46 \pm 0.17$ ;  $47.50 \pm 21.46$  and  $0.88 \pm 0.23$ ) when compared to AA-PBMC ( $0.20 \pm 0.07$ ;  $20.60 \pm 1.75$  and  $0.37 \pm 0.09$ , respectively,  $p < 0.05$ ). Interestingly, gene expression of each of these TLRs was approximately 2.3 times higher in SS-PBMC than AA-PBMC. On the other hand, TLR9 was equally expressed in both SS-PBMC and AA-PBMC (Fig 1).

### **SS-RBC induces TLR9 expression**

Assuming that TLRs are highly expressed in cells of SCA patients, we next tested whether red blood cells from these patients (SS-RBC) are able to induce expression of TLR2, TLR4, TLR5 or TLR9 in AA-PBMC. For this purpose, we isolated AA-PBMC from buffy coat obtained from regular blood donors and incubated these cells in the presence of intact or lysed SS-RBC or RBC from healthy controls (AA-

RBC). Since intact SS-RBC are morphologically distinct from AA-RBC, and intracellular content of RBC are able to induce inflammatory response mediated by innate receptors (POTOKA, GLADWIN, 2015), we hypothesized that both intact and lysed SS-RBC could promote TLRs expression in AA-PBMC.

Intact AA-RBC or SS-RBC were not able to induce expression of TLR2 (Fig 2A), TLR4 (Fig 2C) or TLR5 (Fig 2D), when compared to basal expression of these receptors observed in unstimulated AA-PBMC. On the other hand, lysed AA-RBC and SS-RBC were both good inducers of TLR2, TLR4 and TLR5 expression (Figs 2B, 2D and 2F). This data suggests that intracellular content of RBC, regardless of being from SS or AA individuals, has similar stimulatory effects on the expression of these TLRs, which are not observed when stimulating AA-PBMC with intact RBCs

Nevertheless, it was noteworthy that both intact and lysed SS-RBC, but not AA-RBC, were able to increase TLR9 expression, almost four times, when compared to unstimulated AA-PBMC ( $p < 0.05$ ; Fig 2G and 2H). Therefore, SS-RBC is a good inductor of TLR9 expression, an effect that is not observed for AA-RBC. Moreover, this peculiarity is probably mediated by a danger signal that is present in RBC surface or actively released in the medium, as well as by intracytoplasmic molecules.

### **HU treatment increases expression of TLR2**

Hydroxyurea (HU) is an antineoplastic drug used for treatment of SCA patients and its main expected beneficial effect is improvement in HbF levels. However, it is not clear if HU interferes with the inflammatory condition of these patients. In order to answer this question we incubated AA-PBMC with intact or lysed SS-RBC, treated or not with HU. AA-PBMC incubated with intact SS-RBC and treated with HU showed higher TLR2 gene expression ( $1.03 \pm 0.20$ ) than untreated AA-PBMC stimulated with intact SS-RBC ( $0.78 \pm 0.33$ ;  $p < 0.05$ ; Fig 3A). This effect, however, was not observed when AA-PBMC was incubated with lysed SS-RBC. Lysed SS-RBC induce TLR2 expression, but treatment with HU does not down modulate TLR2 expression (Fig 3B).

Expression of TLR4 and TLR5 were not affected by HU treatment, in both intact and lysed SS-RBC situations (Figs 3C, 3D, 3E and 3F). However, although HU showed no significant modulation of TLR9 expression when AA-PBMC was incubated with intact SS-RBC (Fig 3G), a different scenario was observed for the expression of TLR9 in AA-PBMC cultured with lysed SS-RBC (Fig 3H). Despite lysed



SS-RBC were able to induce TLR9 expression, treatment with HU reduced expression of this receptor in AA-PBMC to similar levels to those seen in unstimulated AA-PBMC.

### **HU does not prevent RBC-induced LTB4 but reduces nitrite production**

SCA patients present increased NO metabolites and LTB4 concentrations (IBE et al., 1994; SETTY, STUART, 2002; GLADWIN, KATO, 2005). Since LTB4 is a lipid involved in inflammation, we tested whether AA- or SS-RBC were able to induce its production, and if HU was able to reverse this condition. As shown in Fig 4A, intact SS-RBC induced higher production of LTB4 when compared to AA-RBC ( $p < 0.05$ ). However, when lysed SS-RBC were used, concentration of LTB4 was significantly reduced when compared to AA-PBMC incubated with lysed AA-RBC (Fig 4B). Interestingly, levels of LTB4 did not differ between cultures stimulated with intact or lysed AA-RBC, whereas under SS-RBC incubation, production of LTB4 was higher when PBMC were stimulated with intact than lysed RBC (Figs 4A and 4B). This effect was not reversed by adding 100  $\mu$ M of hydroxyurea, both in intact and lysed SS-RBC conditions.

We also evaluated the concentration of nitrite, NO metabolism product, in the supernatants of the PBMC cultured with RBC. Differently from what was observed for LTB4, intact SS-RBC induced significantly higher production of nitrite compared to AA-RBC ( $p < 0.05$ ; Fig 5A). However, when lysed RBCs were used, nitrite production was equally high on both AA-RBC or SS-RBC conditions (Fig 5B). Moreover, it was noteworthy that HU treatment was able to decrease nitrite production when AA-PBMC was stimulated with intact or lysed SS-RBC, compared to HU-untreated cultures (Figs 5C and 5D).

## **Discussion**

Innate immune system acts as a first line of defense against pathogens, by recognizing pathogen-associated molecular patterns (PAMPs), but also senses damage associated molecular patterns (DAMPs) from sterile tissue injury. Upon its activation by innate receptors such as Toll like receptors (TLRs), the inflammatory response is initiated and maintained, for as long as the triggering agent is present.

The inflammation in sickle cell anemia is proposed to be dependent on TLR signaling since erythrocyte or its contents released during hemolysis could be recognized as DAMPs (VANCE, ISBERG, PORTNOY, 2009; CERQUEIRA et al., 2011; GUPTA, 2014; CHEN et al., 2015). In this study we demonstrated that TLRs expression is activated in sickle cell anemia (SCA) and in AA-PBMC cultured with red blood cells (RBCs).

Mononuclear cells (PBMC) of SCA patients (SS-PBMC) have high expression of TLR2, TLR4 and TLR5. TLR2 is important for the response against Gram-positive bacteria as well as for nonpathogenic inflammation by identifying different DAMPs. This receptor can form heterodimers with TLR4, which are able to recognize hemoglobin (TAKEUCHI et al., 1999; VAN BERGENHENEGOUWEN et al., 2013; WANG et al., 2014). Although LPS is a well described PAMP for TLR4, there are other agonists even in sterile conditions, such as high mobility group box 1 (HMGB1), heat shock protein (HSP) and heme (LIEW et al., 2005; BELCHER et al., 2014; GUPTA, 2014). Similarly, despite TLR5 is important for defense against pathogens, there are evidences that this receptor is a severity and prognostic biomarker for some inflammatory conditions (PIMENTEL-NUNES et al., 2011; WANG et al., 2012; KAUPPILA et al., 2013; SHERIDAN et al., 2013). Therefore, the expression of these receptors in SS-PBMC patients could be due to continuous exposure to intracellular content of erythrocytes released during intravascular hemolysis or due to exposure to sickle red blood cells (SS-RBCs).

To test this hypothesis, we performed an experiment where PBMC from healthy donors was cultured with lysed or intact SS-RBCs. Interestingly, although expression of TLR9 was similar between SS-PBMC and PBMC from healthy volunteers (AA-PBMC) both intact and lysed SS-RBCs were able to upregulate TLR9 expression in cultured AA-PBMC. This was not observed with TLR2, TLR4 and TLR5 gene expression when using intact RBCs. TLR9 is a receptor that binds to CpG-DNA, which is frequent in bacteria and rare in eukaryotic cells (BAUER, 2013). In addition, although some authors suggest that hemozoin, a heme dimer, acts as TLR9 agonist (COBAN et al., 2010; KALANTARI et al., 2014), in an experimental model of TLR9<sup>-/-</sup>, it was demonstrated that heme-induced inflammation is not dependent on this receptor (FIGUEIREDO et al., 2007). Therefore, the upregulation of TLR9 expression observed in our study was probably not due to the presence of heme. This hypothesis is supported by the observation that expression of TLR9 was also

increased when adding intact SS-RBCs, situation where there are no free heme in the medium.

It is well known that SCA patients have increased reticulocyte counts, cytoplasmic inclusion bodies such as the DNA-rich Howell-Jolly bodies and high levels of fetal hemoglobin (HbF) (STEINBERG, 2005; HARROD et al., 2007; ROGERS et al., 2011). Moreover, the 5' $\gamma$ -globin promoter of HbF presents a high local concentration of CpG residues, which are absent in  $\beta$ -like globin gene promoters (SAUNTHARARAJAH, LAVELLE, DESIMONE, 2004; LESSARD et al., 2015). Thus, since CpG-DNA is a TLR9 agonist, and considering that the expression of this receptor was increased when using intact or lysed SS-RBCs, but not when adding AA-RBC, it is plausible that CpG-DNA released from SS-RBCs could be inducing TLR9 expression probably by a positive paracrine feedback mechanism.

Intracytoplasmic content of AA-RBCs or SS-RBCs was able to induce TLR2, TLR4 and TLR5 expression, suggesting that there are no significant differences in their composition. However, it is noteworthy that intravascular hemolysis does not occur physiologically in healthy volunteers, whereas a great proportion of SCA patients exhibit this condition (TAYLOR et al., 2008; VILAS-BOAS et al., 2010). Hence, the inflammation observed in SCA patients could be a consequence of constant exposure to RBCs' intracytoplasmic content, such as heme (BELCHER et al., 2014), during intravascular hemolysis, leading to the upregulation of toll-like receptors' expression. Additionally, intravascular hemolysis induces release of HMGB1, a nuclear protein involved in regulation of transcription, which, similar to heme, acts as a DAMP and activates TLR4 (XU et al., 2014). In this study we showed that, in addition to TLR4, the expression of TLR2, TLR5 and TLR9 contribute to the inflammatory condition, and could aggravate patient's condition.

Pharmacological control of SCA patients clinical status is achieved mainly by hydroxyurea (HU), an antineoplastic drug that increases HbF levels and reduces SS-RBCs-endothelial interaction (PLATT, 2008; STEINBERG et al., 2010). In this study, we showed that intact SS-RBCs are not able to induce TLR2 expression; however, treatment with HU significantly increased expression of this receptor. TLR2 is associated with NF- $\kappa$ B activation through the MyD88-dependent pathway, stimulates the production of proinflammatory cytokines such as interleukin (IL)-12 and tumor necrosis factor (TNF) (LIEW et al., 2005). Moreover, we demonstrated that HU does not decrease the expression of TLR2, TLR4, TLR5 or TLR9, suggesting that this

treatment, in addition to increasing TLR2 expression, is not able to reduce TLR-mediated inflammation observed in SCA patients.

Leukotrienes (LT) are an important mediators of inflammation, and LTB<sub>4</sub> promotes leukocyte migration and adhesion to the vascular endothelium (SETTY, KULKARNI, STUART, 2002). Our observation that SS-RBC increase LTB<sub>4</sub> production in AA-PBMC compared to AA-RBC is corroborated by the reported of LT production are augmented in PBMC cultured with intact SS-RBC (OPENE et al., 2014). We demonstrated here that intact SS-RBCs induced twice more the production of LTB<sub>4</sub> than AA-RBCs, whereas lysed SS-RBC induced three times less this inflammatory mediator, and treatment with HU does not interfere in this parameter. Since LTB<sub>4</sub> is associated with SCA immunopathogenesis (SETTY, STUART, 2002; KNIGHT-PERRY et al., 2009), our data suggest that, as observed for TLRs, HU treatment does not reverse the inflammatory scenario.

Another mediator associated with inflammatory condition is NO, which acts inducing vasodilation, inhibiting platelet activation, and thus controlling inflammation. During hemolysis, RBC products deplete NO to form its metabolites, such as nitrite, reducing NO bioavailability, which may promote vaso-occlusion episodes (GLADWIN et al., 2003; KATO, GLADWIN, STEINBERG, 2007; ELIAS et al., 2012). In our study, we showed that SS-RBCs/AA-PBMC system induced higher levels of nitrite when compared to AA-RBC/AA-PBMC cultures. However, HU treatment was able to reduce nitrite production, presumably because HU is a NO donator, improving its bioavailability (GLADWIN et al., 2002; BURKITT, RAAFAT, 2006). Once NO is associated with vascular homeostasis, and that the reduction of nitrite levels implicates in higher concentration of bioactive NO (REITER, GLADWIN, 2003), our data suggest a beneficial effect of HU treatment in regard to this parameter, corroborating with other studies (GLADWIN et al., 2002).

SCA is an inflammatory and complex condition considered a public health problem and associated with increased morbidity and mortality. Despite its global relevance, mechanisms that contribute to disease severity are poorly understood. In an attempt to contribute to the field, our data reinforce the hypothesis that red blood cells, especially sickle RBCs, act as DAMPs, stimulating TLR expression and contributing to inflammation. Furthermore, although HU treatment improves several parameters in SCA patients, we highlighted here that HU does not prevent TLR-

dependent inflammation, pointing out the need to develop new drugs that act with different mechanisms of action of those observed for HU.

### **AUTHORS' CONTRIBUTIONS**

TNP, RRO and MSG: conceived the study design. TNP: performed all the experiments. DLZ, CCG, RPS and SSS: assisted in all experiments. VML: responsible for patients' follow-up. VVM, JBL and GQC: discussion and accomplishment of some experiments. MOSC, LCJA and VMB: discussion of study design, experiments and all results. TNP, RRO and MSG: wrote the paper. All authors read and approved the final manuscript.

### **ACKNOWLEDGEMENTS**

We are greatly grateful to SCA patients and all healthy volunteers for trust us and for making possible the realization of this work. We thank the laboratory technicians for help us in the collection of the samples. We would also like to thank Marcia Weber and Cyntia Cajado for excellent discussions. TNP received a scholarship from CAPES. L.C.J.A., V.M.B. and MSG have productivity scholarship from CNPq.

## REFERENCES

- BAHL, N.; DU, R.; WINARSIH, I.; HO, B.; TUCKER-KELLOGG, L.; TIDOR, B.; DING, J. L. (2011). Delineation of lipopolysaccharide (LPS)-binding sites on hemoglobin: from in silico predictions to biophysical characterization. **J Biol Chem** 286(43): 37793-37803.
- BAUER, S. (2013). Toll-like receptor 9 processing: the key event in Toll-like receptor 9 activation? **Immunol Lett** 149(1-2): 85-87.
- BELCHER, J. D.; BRYANT, C. J.; NGUYEN, J.; BOWLIN, P. R.; KIELBIK, M. C.; BISCHOF, J. C.; HEBBEL, R. P.; VERCELLOTTI, G. M. (2003). Transgenic sickle mice have vascular inflammation. **Blood** 101(10): 3953-3959.
- BELCHER, J. D.; CHEN, C.; NGUYEN, J.; MILBAUER, L.; ABDULLA, F.; ALAYASH, A. I.; SMITH, A.; NATH, K. A.; HEBBEL, R. P.; VERCELLOTTI, G. M. (2014). Heme triggers TLR4 signaling leading to endothelial cell activation and vaso-occlusion in murine sickle cell disease. **Blood** 123(3): 377-390.
- BENSOUDA, Y.; LAATIRIS, A. (2006). The lyophilization of dispersed systems: influence of freezing process, freezing time, freezing temperature and RBCs concentration on RBCs hemolysis. **Drug Dev Ind Pharm** 32(8): 941-945.
- CERQUEIRA, B. A.; BOAS, W. V.; ZANETTE, A. D.; REIS, M. G.; GONCALVES, M. S. (2011). Increased concentrations of IL-18 and uric acid in sickle cell anemia: contribution of hemolysis, endothelial activation and the inflammasome. **Cytokine** 56(2): 471-476.
- CHEN, R.; FU, S.; FAN, X. G.; LOTZE, M. T.; ZEH, H. J., 3rd; TANG, D.; KANG, R. (2015). Nuclear DAMP complex-mediated RAGE-dependent macrophage cell death. **Biochem Biophys Res Commun** 458(3): 650-655.
- COBAN, C.; IGARI, Y.; YAGI, M.; REIMER, T.; KOYAMA, S.; AOSHI, T.; OHATA, K.; TSUKUI, T.; TAKESHITA, F.; SAKURAI, K.; IKEGAMI, T.; NAKAGAWA, A.; HORII, T.; NUNEZ, G.; ISHII, K. J.; AKIRA, S. (2010). Immunogenicity of whole-parasite vaccines against *Plasmodium falciparum* involves malarial hemozoin and host TLR9. **Cell Host Microbe** 7(1): 50-61.
- DE MONTALEMBERT, M.; BROUSSE, V.; ELIE, C.; BERNAUDIN, F.; SHI, J.; LANDAIS, P. (2006). Long-term hydroxyurea treatment in children with sickle cell disease: tolerance and clinical outcomes. **Haematologica** 91(1): 125-128.
- DING, A. H.; NATHAN, C. F.; STUEHR, D. J. (1988). Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages. Comparison of activating cytokines and evidence for independent production. **J Immunol** 141(7): 2407-2412.
- FIGUEIREDO, R. T.; FERNANDEZ, P. L.; MOURAO-SA, D. S.; PORTO, B. N.; DUTRA, F. F.; ALVES, L. S.; OLIVEIRA, M. F.; OLIVEIRA, P. L.; GRACA-SOUZA, A. V.; BOZZA, M. T. (2007). Characterization of heme as activator of Toll-like receptor 4. **J Biol Chem** 282(28): 20221-20229.
- GLADWIN, M. T.; SHELHAMER, J. H.; OGNIBENE, F. P.; PEASE-FYE, M. E.; NICHOLS, J. S.; LINK, B.; PATEL, D. B.; JANKOWSKI, M. A.; PANNELL, L. K.; SCHECHTER, A. N.; RODGERS, G. P. (2002). Nitric oxide donor properties of hydroxyurea in patients with sickle cell disease. **Br J Haematol** 116(2): 436-444.

- GUPTA, K. (2014). HMGB1 takes a "Toll" in sickle cell disease. **Blood** 124(26): 3837-3838.
- HARROD, V. L.; HOWARD, T. A.; ZIMMERMAN, S. A.; DERTINGER, S. D.; WARE, R. E. (2007). Quantitative analysis of Howell-Jolly bodies in children with sickle cell disease. **Exp Hematol** 35(2): 179-183.
- IMAI, Y.; KUBA, K.; NEELY, G. G.; YAGHUBIAN-MALHAMI, R.; PERKMANN, T.; VAN LOO, G.; ERMOLAEVA, M.; VELDHUIZEN, R.; LEUNG, Y. H.; WANG, H.; LIU, H.; SUN, Y.; PASPARAKIS, M.; KOPF, M.; MECH, C.; BAVARI, S.; PEIRIS, J. S.; SLUTSKY, A. S.; AKIRA, S.; HULTQVIST, M.; HOLMDAHL, R.; NICHOLLS, J.; JIANG, C.; BINDER, C. J.; PENNINGER, J. M. (2008). Identification of oxidative stress and Toll-like receptor 4 signaling as a key pathway of acute lung injury. **Cell** 133(2): 235-249.
- KALANTARI, P.; DEOLIVEIRA, R. B.; CHAN, J.; CORBETT, Y.; RATHINAM, V.; STUTZ, A.; LATZ, E.; GAZZINELLI, R. T.; GOLENBOCK, D. T.; FITZGERALD, K. A. (2014). Dual engagement of the NLRP3 and AIM2 inflammasomes by plasmodium-derived hemozoin and DNA during malaria. **Cell Rep** 6(1): 196-210.
- KAUPPILA, J. H.; MATTILA, A. E.; KARTTUNEN, T. J.; SALO, T. (2013). Toll-like receptor 5 (TLR5) expression is a novel predictive marker for recurrence and survival in squamous cell carcinoma of the tongue. **Br J Cancer** 108(3): 638-643.
- KNIGHT-PERRY, J.; DEBAUN, M. R.; STRUNK, R. C.; FIELD, J. J. (2009). Leukotriene pathway in sickle cell disease: a potential target for directed therapy. **Expert Rev Hematol** 2(1): 57-68.
- LEFEBVRE, J. S.; LEVESQUE, T.; PICARD, S.; PARE, G.; GRAVEL, A.; FLAMAND, L.; BORGEAT, P. (2011). Extra domain A of fibronectin primes leukotriene biosynthesis and stimulates neutrophil migration through activation of Toll-like receptor 4. **Arthritis Rheum** 63(6): 1527-1533.
- LESSARD, S.; BEAUDOIN, M.; BENKIRANE, K.; LETTRE, G. (2015). Comparison of DNA methylation profiles in human fetal and adult red blood cell progenitors. **Genome Med** 7(1): 1.
- LIEW, F. Y.; XU, D.; BRINT, E. K.; O'NEILL, L. A. (2005). Negative regulation of toll-like receptor-mediated immune responses. **Nat Rev Immunol** 5(6): 446-458.
- PIMENTEL-NUNES, P.; AFONSO, L.; LOPES, P.; RONCON-ALBUQUERQUE, R., Jr.; GONCALVES, N.; HENRIQUE, R.; MOREIRA-DIAS, L.; LEITE-MOREIRA, A. F.; DINIS-RIBEIRO, M. (2011). Increased expression of toll-like receptors (TLR) 2, 4 and 5 in gastric dysplasia. **Pathol Oncol Res** 17(3): 677-683.
- PLATT, O. S. (2000). Sickle cell anemia as an inflammatory disease. **J Clin Invest** 106(3): 337-338.
- PLATT, O. S. (2008). Hydroxyurea for the treatment of sickle cell anemia. **N Engl J Med** 358(13): 1362-1369.
- POTOKA, K. P.; GLADWIN, M. T. (2015). Vasculopathy and pulmonary hypertension in sickle cell disease. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol** 308(4): L314-324.
- REITER, C. D.; GLADWIN, M. T. (2003). An emerging role for nitric oxide in sickle cell disease vascular homeostasis and therapy. **Curr Opin Hematol** 10(2): 99-107.
- ROGERS, Z. R.; WANG, W. C.; LUO, Z.; IYER, R. V.; SHALABY-RANA, E.; DERTINGER, S. D.; SHULKIN, B. L.; MILLER, J. H.; FILES, B.; LANE, P. A.; THOMPSON, B. W.; MILLER, S. T.; WARE, R. E.; BABY, H. U. G.

(2011). Biomarkers of splenic function in infants with sickle cell anemia: baseline data from the BABY HUG Trial. **Blood** 117(9): 2614-2617.

SAUNTHARARAJAH, Y.; LAVELLE, D.; DESIMONE, J. (2004). DNA hypo-methylating agents and sickle cell disease. **Br J Haematol** 126(5): 629-636.

SETTY, B. N.; STUART, M. J. (2002). Eicosanoids in sickle cell disease: potential relevance of neutrophil leukotriene B4 to disease pathophysiology. **J Lab Clin Med** 139(2): 80-89.

SHERIDAN, J.; MACK, D. R.; AMRE, D. K.; ISRAEL, D. M.; CHERKASOV, A.; LI, H.; GRIMARD, G.; STEINER, T. S. (2013). A non-synonymous coding variant (L616F) in the TLR5 gene is potentially associated with Crohn's disease and influences responses to bacterial flagellin. **PLoS One** 8(4): e61326.

STEINBERG, M. H. (2005). Predicting clinical severity in sickle cell anaemia. **Br J Haematol** 129(4): 465-481.

STEINBERG, M. H.; MCCARTHY, W. F.; CASTRO, O.; BALLAS, S. K.; ARMSTRONG, F. D.; SMITH, W.; ATAGA, K.; SWERDLOW, P.; KUTLAR, A.; DECASTRO, L.; WACLAWIW, M. A.; INVESTIGATORS OF THE MULTICENTER STUDY OF HYDROXYUREA IN SICKLE CELL, A.; FOLLOW-UP, M. S. H. P. (2010). The risks and benefits of long-term use of hydroxyurea in sickle cell anemia: A 17.5 year follow-up. **Am J Hematol** 85(6): 403-408.

TAKEUCHI, O.; HOSHINO, K.; KAWAI, T.; SANJO, H.; TAKADA, H.; OGAWA, T.; TAKEDA, K.; AKIRA, S. (1999). Differential roles of TLR2 and TLR4 in recognition of gram-negative and gram-positive bacterial cell wall components. **Immunity** 11(4): 443-451.

TAYLOR, J. G. t.; NOLAN, V. G.; MENDELSON, L.; KATO, G. J.; GLADWIN, M. T.; STEINBERG, M. H. (2008). Chronic hyper-hemolysis in sickle cell anemia: association of vascular complications and mortality with less frequent vasoocclusive pain. **PLoS One** 3(5): e2095.

VAN BEERS, E. J.; YANG, Y.; RAGHAVACHARI, N.; TIAN, X.; ALLEN, D. T.; NICHOLS, J. S.; MENDELSON, L.; NEKHAI, S.; GORDEUK, V. R.; TAYLOR, J. G. t.; KATO, G. J. (2015). Iron, inflammation, and early death in adults with sickle cell disease. **Circ Res** 116(2): 298-306.

VAN BERGENHENEGOUWEN, J.; PLANTINGA, T. S.; JOOSTEN, L. A.; NETEA, M. G.; FOLKERTS, G.; KRANEVELD, A. D.; GARSSSEN, J.; VOS, A. P. (2013). TLR2 & Co: a critical analysis of the complex interactions between TLR2 and coreceptors. **J Leukoc Biol** 94(5): 885-902.

VANCE, R. E.; ISBERG, R. R.; PORTNOY, D. A. (2009). Patterns of pathogenesis: discrimination of pathogenic and nonpathogenic microbes by the innate immune system. **Cell Host Microbe** 6(1): 10-21.

VICARI, P.; ADEGOKE, S. A.; MAZZOTTI, D. R.; CANCADO, R. D.; NOGUTTI, M. A.; FIGUEIREDO, M. S. (2015). Interleukin-1beta and interleukin-6 gene polymorphisms are associated with manifestations of sickle cell anemia. **Blood Cells Mol Dis** 54(3): 244-249.

VILAS-BOAS, W.; CERQUEIRA, B. A.; ZANETTE, A. M.; REIS, M. G.; BARRAL-NETTO, M.; GONCALVES, M. S. (2010). Arginase levels and their association with Th17-related cytokines, soluble adhesion molecules (sICAM-1 and sVCAM-1) and hemolysis markers among steady-state sickle cell anemia patients. **Ann Hematol** 89(9): 877-882.



WANG, R.; AHMED, J.; WANG, G.; HASSAN, I.; STRULOVICI-BAREL, Y.; SALIT, J.; MEZEY, J. G.; CRYSTAL, R. G. (2012). Airway epithelial expression of TLR5 is downregulated in healthy smokers and smokers with chronic obstructive pulmonary disease. **J Immunol** 189(5): 2217-2225.

WANG, Y. C.; ZHOU, Y.; FANG, H.; LIN, S.; WANG, P. F.; XIONG, R. P.; CHEN, J.; XIONG, X. Y.; LV, F. L.; LIANG, Q. L.; YANG, Q. W. (2014). Toll-like receptor 2/4 heterodimer mediates inflammatory injury in intracerebral hemorrhage. **Ann Neurol** 75(6): 876-889.

WEATHERALL, D. J.; PROVAN, A. B. (2000). Red cells I: inherited anaemias. **Lancet** 355(9210): 1169-1175.

WOOD, K. C.; HEBBEL, R. P.; GRANGER, D. N. (2004). Endothelial cell P-selectin mediates a proinflammatory and prothrombotic phenotype in cerebral venules of sickle cell transgenic mice. **Am J Physiol Heart Circ Physiol** 286(5): H1608-1614.

XU, H.; WANDERSEE, N. J.; GUO, Y.; JONES, D. W.; HOLZHAUER, S. L.; HANSON, M. S.; MACHOGU, E.; BROUSSEAU, D. C.; HOGG, N.; DENSMORE, J. C.; KAUL, S.; HILLERY, C. A.; PRITCHARD, K. A., Jr. (2014). Sickle cell disease increases high mobility group box 1: a novel mechanism of inflammation. **Blood** 124(26): 3978-3981.

YANG, K.; ZHANG, X. J.; CAO, L. J.; LIU, X. H.; LIU, Z. H.; WANG, X. Q.; CHEN, Q. J.; LU, L.; SHEN, W. F.; LIU, Y. (2014). Toll-like receptor 4 mediates inflammatory cytokine secretion in smooth muscle cells induced by oxidized low-density lipoprotein. **PLoS One** 9(4): e95935.

## FIGURE LEGENDS

### Figure 1

Toll-like receptor (TLR) 2 (A), TLR4 (B), TLR5 (C) and TLR9 (D) mRNA expression in peripheral blood mononuclear cells (PBMC) of healthy volunteers (AA-PBMC; n = 9) and sickle cell anemia (SCA) patients (SS-PBMC; n = 12). Asterisk marker above each bar represents significant statistic difference between SS-PBMC and AA-PBMC groups (\* $p < 0.05$ ).

### Figure 2

Toll-like receptor (TLR) 2 (A and B), TLR4 (C and D), TLR5 (E and F) and TLR9 (G and H) mRNA expression in peripheral blood mononuclear cells (PBMC) of healthy volunteers challenged with intact (first column) or lysed (second column) red blood cells of healthy volunteers (AA-RBC; n = 9) or sickle cell anemia patients (SS-RBC; n = 12). Asterisk marker above each bar represents significant statistic difference between this and the negative control bar (PBMC). Asterisk marker above horizontal lines represents significant statistic difference between designated groups (\* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ).

### Figure 3

Toll-like receptor (TLR) 2 (A and B), TLR4 (C and D), TLR5 (E and F) and TLR9 (G and H) mRNA expression in peripheral blood mononuclear cells (PBMC) of healthy volunteers challenged with intact (first column) or lysed (second column) red blood cells of sickle cell anemia patients (SS-RBC; n = 12), in the presence or absence of hydroxyurea (HU). Asterisk marker above each bar represents significant statistic difference between this and the negative control bar (PBMC). Asterisk marker above horizontal lines represents significant statistic difference between designated groups (\* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ).

### Figure 4

Levels of leukotriene B4 (LTB4) in culture supernatant of peripheral blood mononuclear cells of healthy volunteers (PBMC) incubated with intact (first column) or lysed (second column) red blood cells of healthy volunteers (AA-RBC; n = 9) or sickle cell anemia patients (SS-RBC; n = 12), in the presence or absence of

hydroxyurea (HU). Asterisk marker above each bar represents significant statistic difference between this and the negative control bar (PBMC). Asterisk marker above horizontal lines represents significant statistic difference between designated groups (\* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ).

### **Figure 5**

Levels of Nitrite in culture supernatant of peripheral blood mononuclear cells of healthy volunteers (PBMC) incubated with intact (first column) or lysed (second column) red blood cells of healthy volunteers (AA-RBC;  $n = 9$ ) or sickle cell anemia patients (SS-RBC;  $n = 12$ ), in the presence or absence of hydroxyurea (HU). Asterisk marker above each bar represents significant statistic difference between this and the negative control bar (PBMC). Asterisk marker above horizontal lines represents significant statistic difference between designated groups (\* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ ).

Figure 1

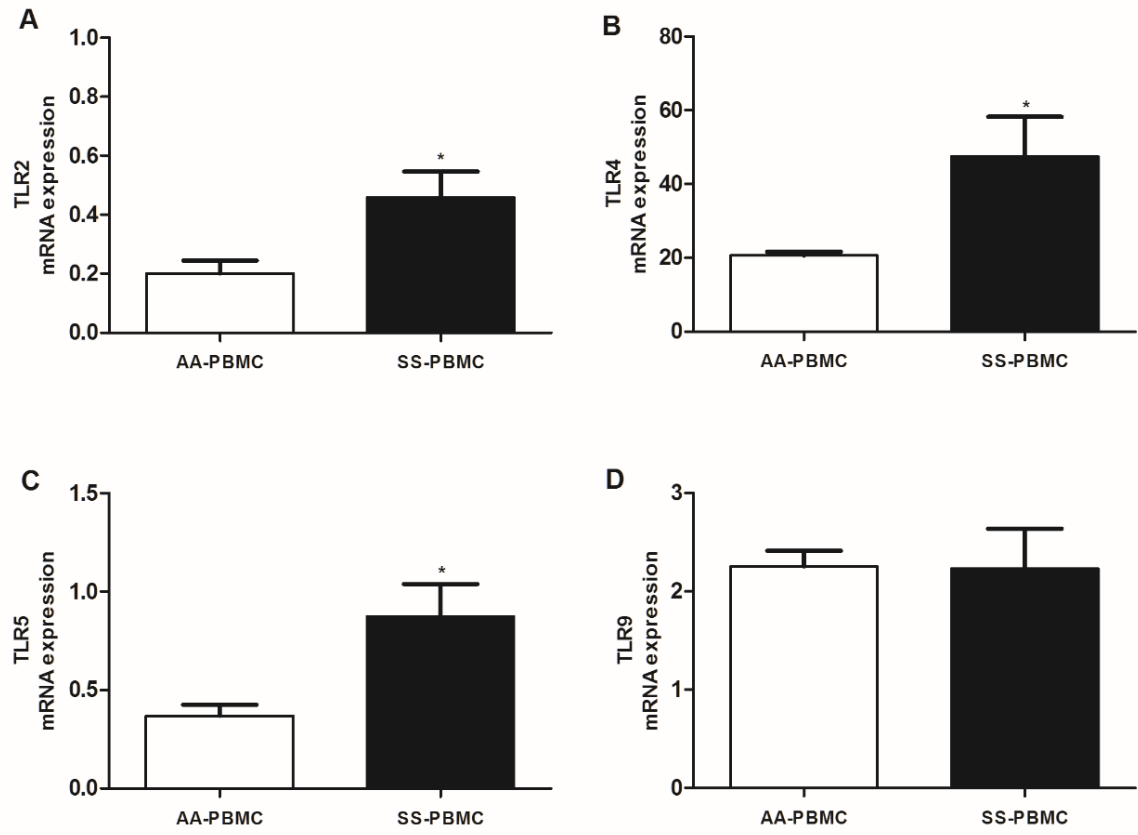


Figure 2

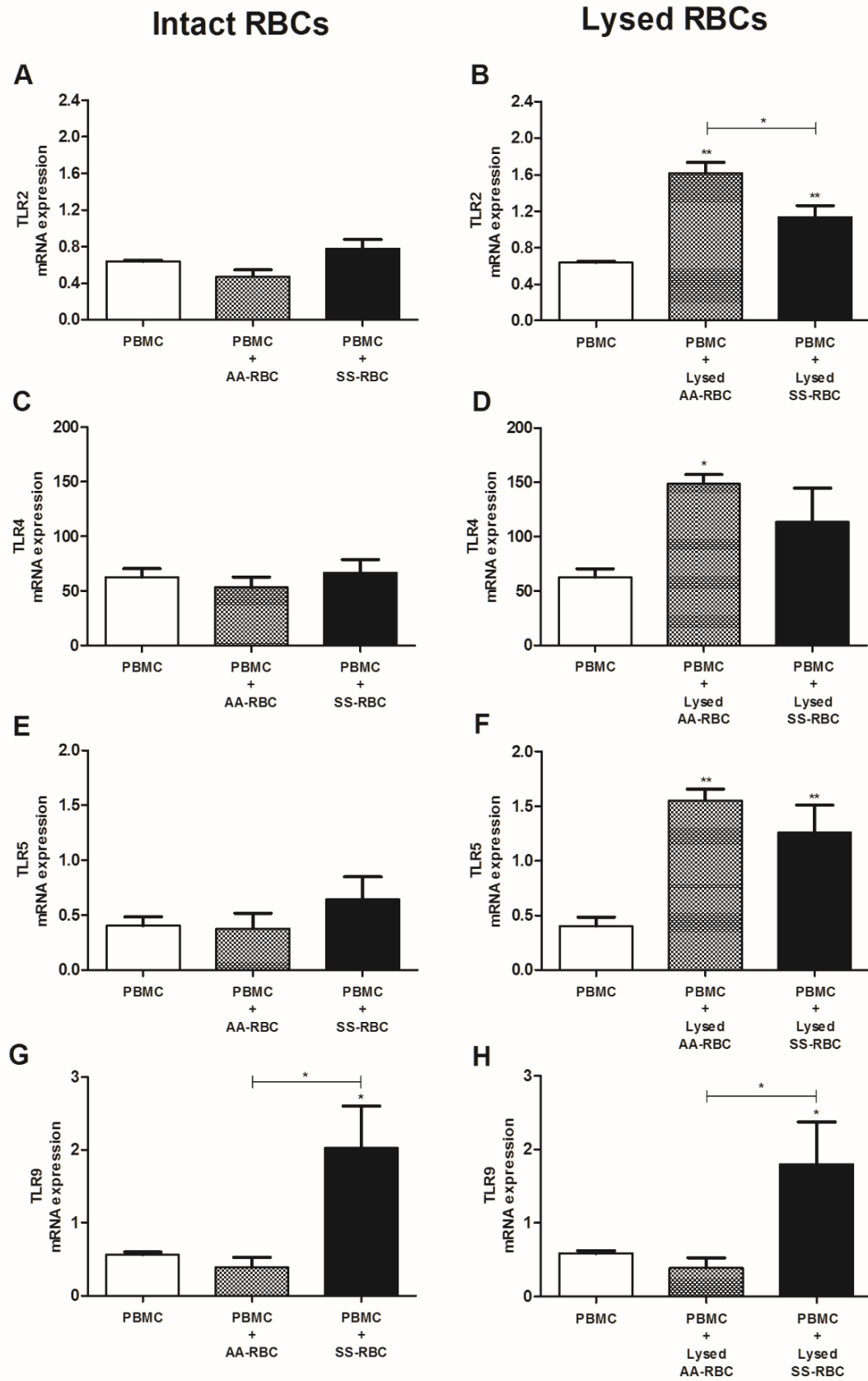


Figure 3

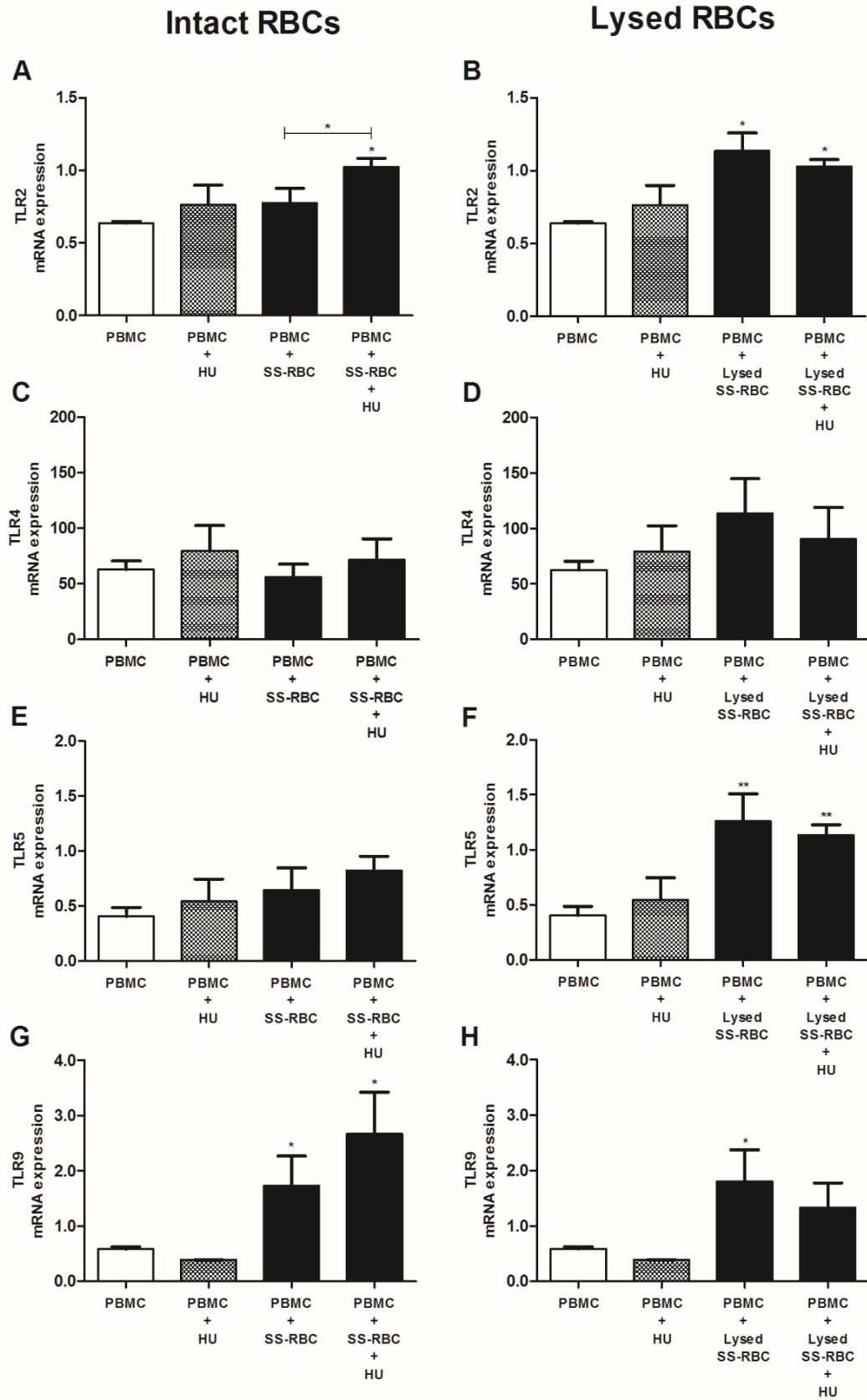


Figure 4

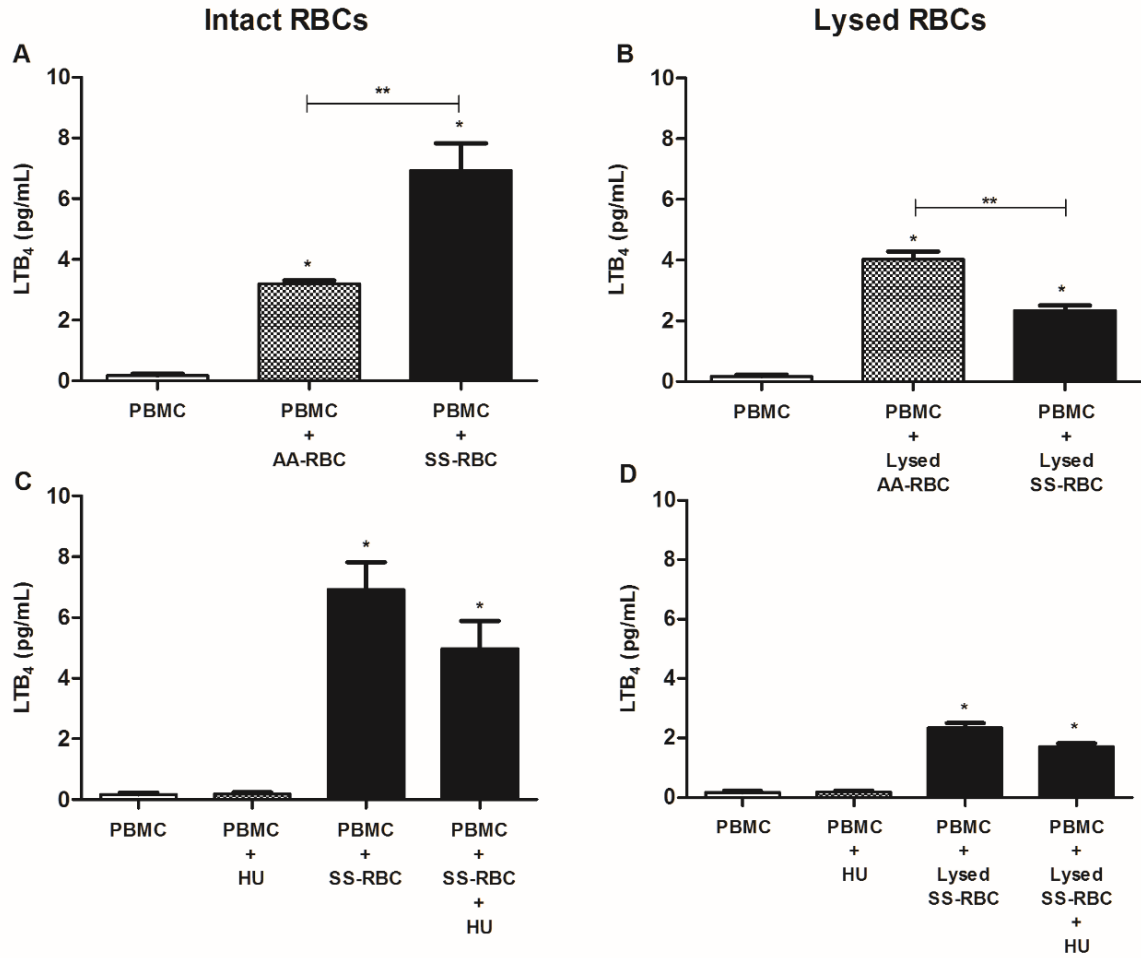
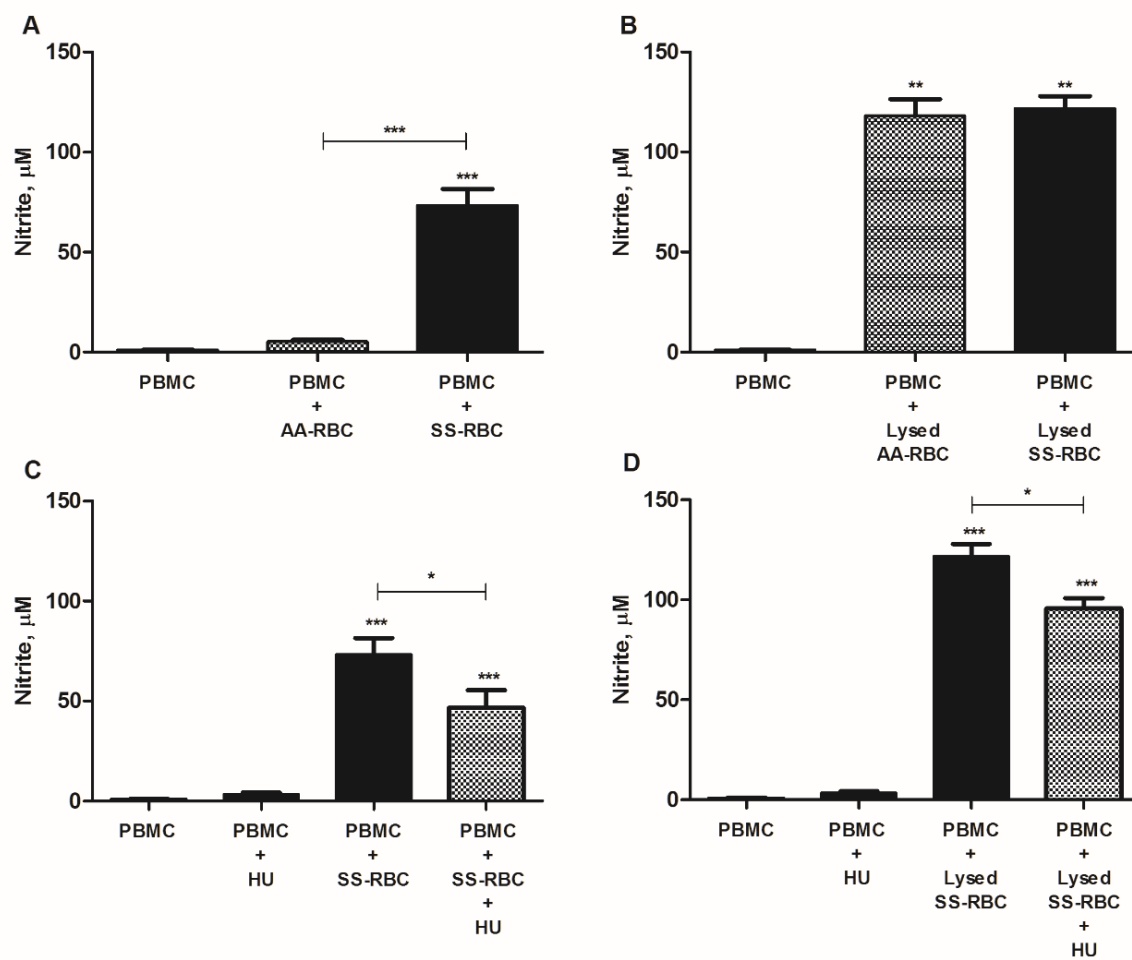


Figure 5





**Table 1** Steady state hematological and biochemical markers values of the SCA patients and healthy volunteers groups.

	<b>SCA patients</b> (n=12) (mean $\pm$ SD)	<b>Healthy volunteers</b> (n=9) (mean $\pm$ SD)	<b>p value*</b>
<b>Age (years)</b>	9.08 $\pm$ 4.72	12.44 $\pm$ 5.60	0.1864
<b>RBC (x10<sup>6</sup>/mL)</b>	2.99 $\pm$ 0.36	4.78 $\pm$ 0.41	<b>&lt;0.0001</b>
<b>Platelets (x10<sup>9</sup>/mL)</b>	441.00 $\pm$ 118.10	307.1 $\pm$ 49.85	<b>0.0056</b>
<b>Leukocyte (x10<sup>9</sup>/mL)</b>	15178 $\pm$ 4474	6767.00 $\pm$ 1716.00	<b>0.0002</b>
<b>Reticulocyte (%)</b>	7.25 $\pm$ 2.05	0.76 $\pm$ 0.17	<b>0.0004</b>
<b>Hemoglobin (g/dL)</b>	8.68 $\pm$ 1.03	13.23 $\pm$ 1.27	<b>0.0004</b>
<b>Fetal Hemoglobin (%)</b>	7.73 $\pm$ 6.26	0.48 $\pm$ 0.42	<b>0.0007</b>
<b>Hematocrit (%)</b>	25.34 $\pm$ 3.53	39.43 $\pm$ 3.18	<b>0.0004</b>
<b>Ferritin (ng/mL)</b>	246.30 $\pm$ 213.80	36.63 $\pm$ 18.53	<b>0.0016</b>
<b>C-reactive protein (mg/L)</b>	5.173 $\pm$ 0.67	1.58 $\pm$ 1.16	<b>0.0163</b>

SCA, sickle cell anemia; SD, standard deviation; RBC, red blood cells

\* Mann-Whitney test; values to  $p < 0.05$  were considered a significant difference

**Table 2** Primer sequences used for qPCR.

<b>Gene</b>	<b>Primer (5' → 3')</b>
<b><i>TLR-2</i></b>	Fw: TTG TGA CCG CAA TGG TAT CTG Rev: GCC CTG AGG GAA TGG AGT TT
<b><i>TLR-4</i></b>	Fw: GGC CAT TGC TGC CAA CAT Rev: CAA CAA TCA CCT TTC GGC TTT T
<b><i>TLR-5</i></b>	Fw: TGT ATG CAC TGT CAC TCT GAC TCT GT Rev: AGC CCC GGA ACT TTG TGA CT
<b><i>TLR-9</i></b>	Fw: AAC CTC CCC AAG AGC CTA CAG Rev: CAG CAC TTA AAG AAG GCC AGG TA
<b><i>GAPDH</i></b>	Fw: CAC ATG GCC TCC AAG GAG TAA Rev: TGA GGG TCT CTC TCT TCC TCT TGT
<b><i>β-ACTINA</i></b>	Fw: CCT GGC ACC CAG CAC AAT Rev: GCC GAT CCA CAC GGA GTA CT

TLR, Toll like receptor; Fw, Forward sequence; Rev, Reverse sequence

### 6.3 Manuscrito 3

**Título:** NLRP3-inflammasome platform contributes to the inflammatory status in sickle cell anemia regardless hydroxyurea treatment

**Autores:** Pitanga, T.N.; Oliveira, R. R; Zanette, D.L.; Guarda, C.C.; Santiago, R.P; Santana, S.S; Lopes, M.V.; Lima, J.B.; Carvalho, G.Q.; Maffili, V.V.; Alcântara, L.C.J.; Borges, V.M.; Goncalves, M.S.

**Situação:** A ser submetido

**Objetivos:** *(referentes aos objetivos 5 a 7 da tese):*

1. Determinar a expressão de genes relacionados a componentes do inflamassoma NLRP3 em PBMC de pacientes com anemia falciforme e de voluntários saudáveis;
2. Avaliar o efeito da adição de hemácias falcizadas na expressão de genes relacionados a componentes do inflamassoma NLRP3 em cultura de PBMC de voluntários saudáveis, tratada ou não com hidroxiureia;
3. Avaliar proteínas relacionadas à ativação do inflamassoma (IL-1 $\beta$  e proteína ligadora de IL-18 [IL-18BP]) em sobrenadante de cultura de PBMC incubada com hemácias falcizadas tratada ou não com hidroxiureia.

**Principais resultados:** células mononucleares de pacientes com AF mostram expressão elevada de NLRP3 e IL-18; hemácias de pacientes AF induzem expressão gênica de caspase-1 e IL-18, e aumentam a secreção de IL-1 $\beta$ ; o tratamento com HU não afeta a expressão de moléculas relacionadas ao inflamassoma e induz aumento da secreção de IL-18BP (proteína ligadora de IL-18).

## **NLRP3-inflammasome platform contributes to the inflammatory status in sickle cell anemia regardless hydroxyurea treatment**

Thassila N. Pitanga,<sup>1,2</sup> Ricardo R. Oliveira,<sup>1</sup> Dalila L. Zanette,<sup>1</sup> Caroline C. Guarda,<sup>1</sup> Rayra P. Santiago,<sup>1</sup> Sânzio S. Santana,<sup>1</sup> Valma M. L. Nascimento,<sup>3</sup> Jonilson B. Lima,<sup>1</sup> Grazielle Q. Carvalho,<sup>1</sup> Vitor V. Maffili,<sup>1</sup> Luiz Carlos J. Alcântara,<sup>1</sup> Valéria M. Borges<sup>1</sup> and Marilda S. Gonçalves<sup>1,4</sup>

<sup>1</sup>Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz – FIOCRUZ/BA

<sup>2</sup>Instituto de Ciências da Saúde (ICS), Universidade Federal da Bahia (UFBA)

<sup>3</sup>Fundação de Hematologia e Hemoterapia da Bahia (HEMOBA)

<sup>4</sup>Faculdade de Farmácia, UFBA, Salvador, Bahia, Brazil.

**RUNNING TITLE:** Sickle cell anemia trigger the NLRP3-inflammasome

**CORRESPONDENCE:** Marilda S. Gonçalves, PhD, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, LHGB, Waldemar Falcão St, n. 121, Candeal, Salvador, Bahia, Brasil. Tel: +55 (71) 3176-2226, e-mail: mari@bahia.fiocruz.br

**CONFLICT OF INTEREST:** All authors declare no conflicts of interest.

**FUNDING:** This work was approved by the Research Ethics Committee (CAAE: 04733612.7.0000.0040) and was supported by grants from the Brazilian National Council of Research (CNPq) (311888/2013-5) (M.S.G.); the Foundation of Research and Extension of Bahia (FAPESB) (3626/2013, 1431040053063, and 9073/2007) (M.S.G.); and PPSUS/FAPESB (020/2013 EFP\_00007295), (M.S.G.); the Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia do Sangue (CNPq) (Coordinated by S.T.O.S.), and MCD/CNPq/MS-SCTIE-DECIT (409800/2006-6), (M.S.G.). Sponsors of this study are public or nonprofit organizations that support science in general. They had no role in gathering analyzing, or interpreting the data.

## Abstract

Sickle Cell Anemia (SCA) is a genetic disorder characterized by systemic inflammation coinciding with vaso-occlusive phenomena, painful episodes and intravascular hemolysis. The nod-like receptor protein 3 (NLRP3)-inflammasome platform could contribute this inflammation, since erythroid contents act as danger signals (eDAMPs) activating this pathway. Our objective was to evaluate expression of NLRP3, Caspase-1, interleukin (IL)-1 $\beta$  and IL-18 in peripheral blood mononuclear cells (PBMC) of SCA patients and the role that erythrocytes play in the expression of these molecules, and *in vitro* effect of Hydroxyurea. PBMC and red blood cells of SCA patients (SS-RBC) and healthy volunteers (AA-RBC) were obtained. PBMC were challenged with SS- or AA-RBC in the presence of hydroxyurea (HU). Inflammasome-related gene expressions were assessed by qPCR. IL-1 $\beta$  and IL-18 binding protein (BP) production were measured in culture supernatants. We found that NLRP3 and IL-1 $\beta$  were highly expressed in PBMC of SCA patients when compared to healthy volunteers. In addition, we showed that intact or lysed SS-RBC, but not AA-RBC, induces Caspase-1 and IL-18 expression, while lysed AA-RBC induces expression of NLRP3 and IL-1 $\beta$ . Moreover, Intact SS-RBC, but not AA-RBC, induces production of IL-1 $\beta$ . Treatment with hydroxyurea (HU) showed no interference with the expression of NLRP3-inflammasome proteins, whereas induced production of IL-18BP. Our data suggest that NLRP3-inflammasome platform contributes to the inflammatory status observed in SCA patients and that HU treatment does not interfere in the inflammatory pathway. This knowledge could lead to the development of new therapeutic strategies, which act in different ways from those given by hydroxyurea.

**Keywords:** Sickle cell disease; hydroxyurea; NOD-like receptors; NLRP3-inflammasome; eDAMP.

## Introduction

Sickle Cell Anemia (SCA) is a hereditary disease characterized by the production of abnormal red cells, presence of homozygous hemoglobin S (HbSS) and dysfunction on oxygen transportation. Although some patients present no symptoms, SCA is an inflammatory condition associated with vaso-occlusive and painful episodes, increased susceptibility to infections and intravascular hemolysis (PLATT, 2000; WEATHERALL, PROVAN, 2000; TAYLOR et al., 2008; NEBOR et al., 2011).

Hemoglobin and heme group released during intravascular hemolysis activate endothelial cells, leukocytes and platelets, leading to systematic inflammation and contributing to pro-thrombotic and vaso-occlusive phenomena observed in SCA patients (BELCHER et al., 2003; WOOD, HEBBEL, GRANGER, 2004). The maintenance of the inflammatory condition is mediated by the immune system, especially the innate immune system, which is able to recognize danger-associated molecular patterns (DAMPs) by NOD-like receptors (NLRs) (CERQUEIRA et al., 2011; VICARI et al., 2015).

Cellular residues and other endogenous molecules, released during intravascular hemolysis, are able to act as signals for tissue injury, and are recognized by NLRs. High-Mobility Group Protein B1 (HMGB1), and heme are the major DAMPs considered as NLR agonists (DUTRA et al., 2014; GLADWIN, OFORI-ACQUAH, 2014; GUPTA, 2014; XU et al., 2014).

Nod-like receptors are grouped into five subfamilies (NLRA, NLRB, NLRC, NLRP and NLRX) depending on the composition of their N-terminal domain. Under activation, the central domain of these receptors oligomerizes resulting in an inflammatory multi-protein platform, named the inflammasome. Although several inflammasome platforms have been proposed, the NLRP3-associated inflammasome is the most widely studied (TING et al., 2008; SCHRODER, TSCHOPP, 2010; YERETSSIAN, 2012; LATZ, XIAO, STUTZ, 2013).

Classically, inflammasome consists of NLRP (usually NLRP3, NOD-like receptor family, pyrin domain containing 3), inflammatory protease Caspase-1 and the Apoptosis-Associated Speck-Like Protein Containing Card (ASC). Following activation, NLRP3 recruits ASC and pro-caspase-1 in a process that requires participation of NF- $\kappa$ B, as a first-step of NLRP3 activation, and NLRP3

oligomerization itself as a second-step of activation, in order to convert pro-caspase-1 into its active form. Then, active caspase-1 converts the inflammatory cytokines IL-1 $\beta$  and IL-18 into active forms, contributing to pathology severity (MARTINON, BURNS, TSCHOPP, 2002; AGOSTINI et al., 2004; MARIATHASAN, MONACK, 2007; BAUERNFEIND et al., 2009; BAUERNFEIND et al., 2011; ZHOU et al., 2011; GHONIME et al., 2014).

IL-1 $\beta$  and IL-18 are pro-inflammatory cytokines engaged with the innate immune response in both infection and aseptic inflammation. Levels of these cytokines have been associated with different clinical inflammatory conditions, such as multiple sclerosis, cancer, Alzheimer's disease, arthritis and sickle cell anemia (GUMA et al., 2010; CERQUEIRA et al., 2011; KITAZAWA et al., 2011; RAMIREZ-RAMIREZ et al., 2013; KETELUT-CARNEIRO et al., 2015; TAS et al., 2015; VICARI et al., 2015). Levels or polymorphisms of IL-1 $\beta$  and IL-18 have been correlated with clinical complications, such as cerebrovascular accident, intravascular hemolysis and endothelial dysfunction, contributing to the disease severity and to the therapeutic failure (ASARE et al., 2010; CERQUEIRA et al., 2011; VICARI et al., 2015).

Therapy with hydroxyurea seems to be the best treatment available for SCA patients. HU exhibits a cytotoxic effect by inhibiting ribonucleotide reductase enzyme contributing for its main pharmacologic mechanism – increasing levels of HbF (DE MONTALEMBERT et al., 2006; PLATT, 2008; LEBENSBURGER et al., 2010).

In this study, we evaluated the expression of NLRP3, Caspase-1, interleukin (IL)-1 $\beta$  and IL-18 and production of IL-1 $\beta$  and IL-18 bind protein (IL-18BP) in peripheral blood mononuclear cells (PBMC) of SCA patients. In addition, we investigated the participation of RBCs obtained from SCA patients (SS-RBCs) in modulating the expression of these genes and production of cytokines in PBMC from healthy donors (AA-PBMCs), as well as the *in vitro* effect of hydroxyurea in the expression of these inflammatory markers.

## **Methods**

### **SCA patients and healthy volunteers**

Patients were recruited from Hematology and Hemotherapy Foundation of the State of Bahia (HEMOBA) and healthy volunteers (individuals without hematological

disorder or inflammatory conditions) from Pharmacy College (FacFAR) of Federal University of Bahia. A cross-sectional study performed comprising 10 sickle cell anemia (SCA) patients in steady-state (age  $10.3 \pm 4.6$  years) and 7 healthy volunteers (age  $14.5 \pm 5.2$  years). No patient required blood transfusion in a period of four months prior to blood draw, or presented any infection, hospitalization or vaso-occlusive event. Although all patients were being treated with folic acid, none was using antibiotics, corticosteroids or hydroxyurea. Demographic, hematological and biochemical parameters of both groups are showed in Table 1. Although subjects from both groups has similar age, all biochemical and hematological parameters, except for levels of alpha-1 antitrypsin and alanine aminotransferase, were worse in the SCA group. This study was approved by the Research Ethics Committee of the Oswaldo Cruz Foundation, and was developed in accordance with the Declaration of Helsinki of 1975 as revised in 2008. All subjects or their legal guardians agreed to collect the biological sample after reading the terms in the informed consent.

### **Blood collection and isolation of human mononuclear and red blood cells**

Venous blood was collected from patients and controls in order to determine hemoglobin profile by high-performance liquid chromatography, and to obtain red blood cells (RBC) for cell culture experiments and peripheral blood mononuclear cells (PBMC) for gene expression analysis. Additionally, PBMCs used for cell culture (PBMC culture) experiments were obtained from fresh leukocytes concentrates (buffy coat) of healthy donors from HEMOBA by using the gradient Ficoll-Hypaque (GE Healthcare Bio-Sciences Corp. Piscataway, NJ, USA). RBC were isolated by centrifugation from peripheral blood of SCA patients (SS-RBC) and controls (AA-RBC). Lysed erythrocytes was obtained by maintaining RBC concentrate at  $-70^{\circ}\text{C}$  for 3 hours and subsequently thawed (purity  $>90\%$ ). (BENSOU DA, LAATIRIS, 2006)

PBMC from buffy coat bags were counted, distributed in 24-well plate (Costar, Corning, NY, USA) at a concentration of  $3 \times 10^6$  mononuclear cells/mL and cultured with 3% of lysed or intact RBC for 24h at  $37^{\circ}\text{C}$  and 5%  $\text{CO}_2$ , in the presence or absence of 100  $\mu\text{M}$  hydroxyurea (HU) (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA) (STEINBERG et al., 2010).



### **IL-1 $\beta$ e IL-18 bind protein (IL-18BP) production by PBMC culture**

IL-1 $\beta$  and IL-18BP production was assessed using IL-1 $\beta$  and IL-18BP (R&D Systems, Minneapolis, USA) ELISA kits, according to the manufacturer's instructions. *In vitro* IL-1 $\beta$  production was analyzed in supernatants harvested from the PBMC, exposed to intact or lysed erythrocytes from AF patients for 24h.

### **Quantification of gene expressions**

Extraction of mRNA from PBMC of SCA patients and PBMC cultures was performed by using Trizol reagent (Invitrogen, Life Technologies, CA, USA) according to the manufacturer's instructions. The RNA obtained was measured by spectrophotometer NanoDrop™ Lite Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, USA). Reverse transcription was performed using the High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems™, Foster City, CA) according to the manufacturer's instructions. NLRP3, IL-1 $\beta$  e IL-18, Caspase-1, GAPDH and  $\beta$ -ACTIN gene expression analysis by qPCR was performed on an ABI 7500 FAST Real-Time PCR equipment (Applied Biosystems™, Foster City, CA). The amplification reactions were performed with Power SYBR® Green, according to manufacturer's instructions. Primers used for qPCR reactions are shown in Table 2. After amplification and dissociation curve runs, the values of threshold cycle (Ct) were obtained with the aid of the Operational Programme 7500™ System (Applied Biosystems, USA). Expression levels were normalized based on the geometric mean of GAPDH and  $\beta$ -ACTIN, endogenous controls. Relative expression folds were calculated based on  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  method.(PFAFFL, 2001)

### **Statistical analysis**

Comparison of quantitative variables between groups was performed by unpaired Student's t test for normal distribution data and by the Mann-Whitney test for non-normally distributed data. The non-parametric ANOVA Kruskal-Wallis was used for comparison between three or more groups. Values of  $p < 0.05$  were considered as significant different. All data were analyzed using Prism 5.1 software (GraphPad, San Diego, USA).

## Results

### **PBMC of SCA patients highly express NLRP3 and IL-1 $\beta$ genes**

SCA is a genetic disorder in which an intense inflammatory response is observed, associated with intravascular hemolysis and activation of leukocytes, endothelial cells and platelets. We hypothesized that red cells from SCA patients, as well as their intracytoplasmic contents, act as danger signals for the activation of NLRP3 inflammasome. In attempt to test this hypothesis, we first evaluated the expression of NLRP3, Caspase-1, IL-1 $\beta$  and IL-18 in peripheral blood mononuclear cells obtained from SCA patients (SS-PBMC) and healthy controls (AA-PBMC).

Expression of NLRP3 and IL-1 $\beta$  was significantly higher in SS-PBMC ( $2.30 \pm 1.02$  and  $2.84 \pm 1.08$ ) as compared to AA-PBMC ( $0.75 \pm 0.13$  and  $1.24 \pm 0.38$ , respectively,  $p < 0.05$ ). On the other hand, mRNA expression of Caspase-1 and IL-18 did not differ between PBMC from healthy volunteers and SCA patients (Figure 1).

### **SS-RBC induces Caspase-1 and IL-18 expression**

Since it has been shown that SS-PBMC expresses mediators associated with NLRP3 inflammasome, we decided to investigate whether red blood cells of SCA patients act as DAMPs for the activation of NLRP3 inflammasome. For this purpose, we isolated AA-PBMC from regular blood donors and incubated these cells in the presence of intact or lysed SS-RBC or RBC from healthy controls (AA-RBC). Since intact SS-RBC are morphologically distinct from AA-RBC, and intracellular contents of RBC are able to induce inflammatory response mediated by innate receptors (POTOKA, GLADWIN, 2015), we hypothesized that both intact and lysed SS-RBC could promote the expression of molecules involved in NLRP3 inflammasome activation in AA-PBMC.

We demonstrated here that intact AA-RBC were not able to induce expression of NLRP3, Caspase-1, IL-1 $\beta$  or IL-18, when compared to basal expression of these receptors observed in unstimulated AA-PBMC (Figures 2 A, C, E, G). In contrast, intact SS-RBC induced higher expression of NLRP3, Caspase-1, IL-1 $\beta$  and IL-18 than unstimulated PBMC did. Lysed AA-RBC induced higher expression of NLRP3

and IL- $\beta$ , whereas SS-RBC induced higher expression of NLRP3, Caspase-1 and IL-18, when compared to unstimulated cell cultures.

Interestingly, intact SS-RBC induced higher expression of Caspase-1 when compared to AA-RBC (Figure 2C). Moreover, Caspase-1 and IL-18 were more expressed in PBMC challenged with lysed SS-RBC ( $3.54 \pm 2.01$  and  $2.41 \pm 1.25$ ) when compared to lysed AA-RBC ( $0.08 \pm 0.02$  and  $0.26 \pm 0.06$ , respectively,  $p < 0.05$ , Figure 2 D, H). These data suggest that intact and lysed SS-RBC are good inductors of Caspase-1 or IL-18 expression, which was not observed for AA-RBC.

### **HU treatment does not affect expression of NLRP3 inflammasome-related molecules**

Hydroxyurea (HU) is a cytotoxic drug used for treatment of SCA patients and its main expected beneficial effect is the improvement in HbF levels. However, it is not clear whether HU acts controlling the inflammatory condition in these patients. We sought to investigate this issue by incubating AA-PBMC with intact or lysed SS-RBC, in the presence or absence of HU.

Expression of NLRP3, Caspase-1, IL-1 $\beta$  and IL-18 were not affected by HU treatment, in both intact and lysed SS-RBC conditions (Figure 3). Thus, besides HU has a positive effect on HbF production, our data suggested that this drug is not able to interfere positively in the control of the inflammatory condition.

### **Intact SS-RBC, but not AA-RBC, induces production of IL-1 $\beta$**

In addition to assessing gene expression, we also evaluated protein production, especially IL-1 $\beta$  and IL-18 binding protein (IL-18BP). IL-1 $\beta$  is secreted upon activation of NLRP3-inflammasome, whereas IL-18BP is a protein that binds to soluble IL-18, preventing the binding of IL-18 to its receptor, (DINARELLO et al., 2013) Therefore, production of IL-18BP might be understood as a compensatory mechanism to regulate IL-18 activity, a cytokine that is also produced after NLRP3 inflammasome activation.

It was observed that both intact and lysed SS-RBC and AA-RBC induced production of IL-1 $\beta$  and IL-18BP (Figure 4). However, levels of IL-1 $\beta$  in response to intact AA-RBC were similar to those was observed for unstimulated cultures, and

intact SS-RBC was able to induce production of higher levels of IL-1 $\beta$ , when compared to intact AA-RBC stimulated cultures (Figure 4A). This data reinforces the hypothesis that SS-RBC, as opposed to AA-RBC, activates an inflammatory response mediated by receptors from the innate immune system.

### **HU induces production of IL-18BP but does not affect IL-1 $\beta$ production**

HU showed no effect in down-regulating IL-1 $\beta$  production induced by intact or lysed SS-RBC on AA-PBMC (Figures 5 A-B). However, HU up-regulated IL-18BP production induced by lysed SS-RBC, when comparing with untreated cells (Figure 5D), suggesting that HU might play an important role controlling the inflammatory effects of IL-18, which could be beneficial for the treatment of SCA patients.

### **Discussion**

In this study, we showed that NLRP3-inflammasome is an important innate immune platform for the recognition of DAMPs derived from sickle red cell or its contents. Sickle cell anemia (SCA) patients exhibited high expression of NLRP3 and IL-1 $\beta$  in mononuclear cells (PBMC) and SS-RBC induced Caspase-1 and IL-18 expression and production of IL-1 $\beta$ . Hydroxyurea treatment did not affect expression of NLRP3 inflammasome-related molecules, but induced production of IL-18BP.

The most common inflammasome is associated with NLRP3, caspase-1 and ASC. Several danger signals has been well documented as NLRP3-inflammasome agonists, such as extracellular ATP, glucose, hyaluronan, alum and asbestos (SCHRODER, TSCHOPP, 2010). More recently, some authors have demonstrated red cells or its contents as DAMPs for NLRP3 inflammasome activation, and proposed erythroid DAMPs (eDAMPs) as a new terminology for these signals of red cells injury.(GLADWIN, OFORI-ACQUAH, 2014; POTOKA, GLADWIN, 2015) Following NLRP3 activation, caspase-1 becomes active and, consequently, converts pro-IL-1 $\beta$  and pro-IL-18 in their active forms which are secreted in the extracellular milieu (MARIATHASAN, MONACK, 2007).

In this study, we did not find any differences in the expressions of caspase-1 and IL-18 between AA-PBMC and SS-PBMC; however, NLRP3 and IL-1 $\beta$  were more expressed in SS-PBMC. It was documented that many of the same stimuli induce

expression of both pro-IL-1 $\beta$  and NLRP3, and that IL-18 and caspase-1 are constitutively expressed in many cells (GUARDA et al., 2011; DINARELLO et al., 2013) corroborating our results.

Since hematological parameters, such as RBCs count, hemoglobin levels and frequency of reticulocytes were substantially different in the SCA group when compared to healthy volunteers, we tested the effect to RBC in the activation of the NLRP3 inflammatory pathway. Interestingly, intact SS-RBCs were potent eDAMPs, as they induced expression of all NLRP3-inflammasome related molecules evaluated here. Moreover, lysed SS-RBCs increased caspase-1 and IL-18 expression whereas lysed AA-RBCs induced higher expression of NLRP3 and IL-1 $\beta$ . These results suggest that erythrocyte composition differs between AA- and SS-RBCs regarding inflammasome pathway activation. Despite the observed contribution of lysed AA-RBCs to IL-1 $\beta$  and NLRP3 expression, it is important to point out that intravascular hemolysis does not occur physiologically in healthy volunteers, whereas a great proportion of SCA patients exhibit this condition (TAYLOR et al., 2008; VILAS-BOAS et al., 2010). Hence, the inflammation observed in SCA patients could be a consequence of constant exposure to eDAMPs (intact or lysed RBCs), such as heme (DUTRA et al., 2014), during intravascular hemolysis, which leads to upregulation of NOD-like receptors expression, suggesting that these molecules could be therapeutic targets for SCA.

Hydroxyurea is an important agent used to treat SCA patients that acts increasing HbF levels and reducing SS-RBCs-endothelial interaction (PLATT, 2008; STEINBERG et al., 2010). In this study, we demonstrated that HU does not interfere in the expression of NLRP3, caspase-1, IL-1 $\beta$  and IL-18, suggesting that HU mechanism of action is not associated with NLRP3-inflammasome pathway, thus is not able to act controlling inflammasome-dependent inflammatory conditions observed in SCA patients.

In addition to gene expression, we also evaluated production of IL-1 $\beta$  and IL-18 binding protein (IL-18BP). IL-18BP is a protein that binds to IL-18 preventing the attachment with its receptor, contributing to decrease the inflammatory response (CARBOTTI et al., 2013; DINARELLO et al., 2013). We showed here that both intact and lysed SS-RBCs induced IL-1 $\beta$  production, whereas, only lysed AA-RBCs demonstrated this property. On the other hand, IL-18BP was induced in all

conditions, suggesting that its production is not associated with specific eDAMP from SS-RBCs.

Although plasma levels of IL-18BP are significantly increased in inflammatory conditions (DINARELLO et al., 2003), in our *in vitro* model we found higher gene expression of IL-18 in SS-RBCs-stimulated PBMC, and found no difference in the concentration of IL-18BP in supernatant of PBMC-stimulated with AA- or SS-RBCs. Upon HU treatment, although we did not observe any interference in IL-18 expression, this drug was able to increase the levels of its inhibitor (IL-18BP) in our model of *in vitro* hemolysis, what was not observed when using intact RBCs. Therefore, during intravascular hemolysis, HU might have beneficial effects in the inflammatory control by reducing IL-18 attachment in IL-18 receptor.

Our data reinforce that NLRP3-inflammasome platform, an important and well-known inflammatory pathway, could be contributing to the clinical inflammatory status observed in SCA patients. This knowledge could lead to the development of new therapeutic strategies targeting, preferentially, sickle cell eDAMPs or NLRP3-inflammasome-associated molecules.

## **AUTHORS' CONTRIBUTIONS**

TNP, RRO and MSG: conceived the study design. TNP: performed all the experiments. DLZ, CCG, RPS and SSS: assisted in all experiments. VML: responsible for patients' follow-up. VVM, JBL and GQC: discussion and accomplishment of some experiments. LCJA and VMB: discussion of study design, experiments and all results. TNP, RRO and MSG: wrote the paper. All authors read and approved the final manuscript.

## **ACKNOWLEDGEMENTS**

The authors would like to thank SCA patients and all healthy volunteers for trust us and for making possible the realization of this work. We thank the laboratory technicians for help us in the collection of the samples. We would also like to thank Wendell Vilas Boas, Bruno Cerqueira, Magda Seixas and Marcia Weber for excellent

discussions. TNP received a scholarship from CAPES. L.C.J.A., V.M.B. and MSG have productivity scholarship from CNPq.

## REFERENCES

- AGOSTINI, L.; MARTINON, F.; BURNS, K.; MCDERMOTT, M. F.; HAWKINS, P. N.; TSCHOPP, J. (2004). NALP3 forms an IL-1beta-processing inflammasome with increased activity in Muckle-Wells autoinflammatory disorder. **Immunity** 20(3): 319-325.
- ASARE, K.; GEE, B. E.; STILES, J. K.; WILSON, N. O.; DRISS, A.; QUARSHIE, A.; ADAMS, R. J.; KUTLAR, A.; HIBBERT, J. M. (2010). Plasma interleukin-1beta concentration is associated with stroke in sickle cell disease. **Cytokine** 49(1): 39-44.
- BAUERNFEIND, F.; BARTOK, E.; RIEGER, A.; FRANCHI, L.; NUNEZ, G.; HORNING, V. (2011). Cutting edge: reactive oxygen species inhibitors block priming, but not activation, of the NLRP3 inflammasome. **J Immunol** 187(2): 613-617.
- BAUERNFEIND, F. G.; HORVATH, G.; STUTZ, A.; ALNEMRI, E. S.; MACDONALD, K.; SPEERT, D.; FERNANDES-ALNEMRI, T.; WU, J.; MONKS, B. G.; FITZGERALD, K. A.; HORNING, V.; LATZ, E. (2009). Cutting edge: NF-kappaB activating pattern recognition and cytokine receptors license NLRP3 inflammasome activation by regulating NLRP3 expression. **J Immunol** 183(2): 787-791.
- BELCHER, J. D.; BRYANT, C. J.; NGUYEN, J.; BOWLIN, P. R.; KIELBIK, M. C.; BISCHOF, J. C.; HEBBEL, R. P.; VERCELLOTTI, G. M. (2003). Transgenic sickle mice have vascular inflammation. **Blood** 101(10): 3953-3959.
- BENSOUDA, Y.; LAATIRIS, A. (2006). The lyophilization of dispersed systems: influence of freezing process, freezing time, freezing temperature and RBCs concentration on RBCs hemolysis. **Drug Dev Ind Pharm** 32(8): 941-945.
- CARBOTTI, G.; BARISIONE, G.; ORENGO, A. M.; BRIZZOLARA, A.; AIROLDI, I.; BAGNOLI, M.; PINCIROLI, P.; MEZZANZANICA, D.; CENTURIONI, M. G.; FABBI, M.; FERRINI, S. (2013). The IL-18 antagonist IL-18-binding protein is produced in the human ovarian cancer microenvironment. **Clin Cancer Res** 19(17): 4611-4620.
- CERQUEIRA, B. A.; BOAS, W. V.; ZANETTE, A. D.; REIS, M. G.; GONCALVES, M. S. (2011). Increased concentrations of IL-18 and uric acid in sickle cell anemia: contribution of hemolysis, endothelial activation and the inflammasome. **Cytokine** 56(2): 471-476.
- DE MONTALEMBERT, M.; BROUSSE, V.; ELIE, C.; BERNAUDIN, F.; SHI, J.; LANDAIS, P. (2006). Long-term hydroxyurea treatment in children with sickle cell disease: tolerance and clinical outcomes. **Haematologica** 91(1): 125-128.
- DINARELLO, C. A.; NOVICK, D.; KIM, S.; KAPLANSKI, G. (2013). Interleukin-18 and IL-18 binding protein. **Front Immunol** 4: 289.
- DINARELLO, C. A.; NOVICK, D.; RUBINSTEIN, M.; LONNEMANN, G. (2003). Interleukin 18 and interleukin 18 binding protein: possible role in immunosuppression of chronic renal failure. **Blood Purif** 21(3): 258-270.
- DUTRA, F. F.; ALVES, L. S.; RODRIGUES, D.; FERNANDEZ, P. L.; DE OLIVEIRA, R. B.; GOLENBOCK, D. T.; ZAMBONI, D. S.; BOZZA, M. T. (2014). Hemolysis-induced lethality involves inflammasome activation by heme. **Proc Natl Acad Sci U S A** 111(39): E4110-4118.



GHONIME, M. G.; SHAMAA, O. R.; DAS, S.; ELDOMANY, R. A.; FERNANDES-ALNEMRI, T.; ALNEMRI, E. S.; GAVRILIN, M. A.; WEWERS, M. D. (2014). Inflammasome priming by lipopolysaccharide is dependent upon ERK signaling and proteasome function. **J Immunol** 192(8): 3881-3888.

GLADWIN, M. T.; OFORI-ACQUAH, S. F. (2014). Erythroid DAMPs drive inflammation in SCD. **Blood** 123(24): 3689-3690.

GUARDA, G.; ZENGER, M.; YAZDI, A. S.; SCHRODER, K.; FERRERO, I.; MENU, P.; TARDIVEL, A.; MATTMANN, C.; TSCHOPP, J. (2011). Differential expression of NLRP3 among hematopoietic cells. **J Immunol** 186(4): 2529-2534.

GUMA, M.; KASHIWAKURA, J.; CRAIN, B.; KAWAKAMI, Y.; BEUTLER, B.; FIRESTEIN, G. S.; KAWAKAMI, T.; KARIN, M.; CORR, M. (2010). JNK1 controls mast cell degranulation and IL-1 $\beta$  production in inflammatory arthritis. **Proc Natl Acad Sci U S A** 107(51): 22122-22127.

GUPTA, K. (2014). HMGB1 takes a "Toll" in sickle cell disease. **Blood** 124(26): 3837-3838.

KETELUT-CARNEIRO, N.; SILVA, G. K.; ROCHA, F. A.; MILANEZI, C. M.; CAVALCANTI-NETO, F. F.; ZAMBONI, D. S.; SILVA, J. S. (2015). IL-18 Triggered by the Nlrp3 Inflammasome Induces Host Innate Resistance in a Pulmonary Model of Fungal Infection. **J Immunol**.

KITAZAWA, M.; CHENG, D.; TSUKAMOTO, M. R.; KOIKE, M. A.; WES, P. D.; VASILEVKO, V.; CRIBBS, D. H.; LAFERLA, F. M. (2011). Blocking IL-1 signaling rescues cognition, attenuates tau pathology, and restores neuronal beta-catenin pathway function in an Alzheimer's disease model. **J Immunol** 187(12): 6539-6549.

LATZ, E.; XIAO, T. S.; STUTZ, A. (2013). Activation and regulation of the inflammasomes. **Nat Rev Immunol** 13(6): 397-411.

LEBENSBURGER, J. D.; PESTINA, T. I.; WARE, R. E.; BOYD, K. L.; PERSONS, D. A. (2010). Hydroxyurea therapy requires HbF induction for clinical benefit in a sickle cell mouse model. **Haematologica** 95(9): 1599-1603.

MARIATHASAN, S.; MONACK, D. M. (2007). Inflammasome adaptors and sensors: intracellular regulators of infection and inflammation. **Nat Rev Immunol** 7(1): 31-40.

MARTINON, F.; BURNS, K.; TSCHOPP, J. (2002). The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL-beta. **Mol Cell** 10(2): 417-426.

NEBOR, D.; BOWERS, A.; HARDY-DESSOURCES, M. D.; KNIGHT-MADDEN, J.; ROMANA, M.; REID, H.; BARTHELEMY, J. C.; CUMMING, V.; HUE, O.; ELION, J.; REID, M.; CONNES, P.; GROUP, C. S. (2011). Frequency of pain crises in sickle cell anemia and its relationship with the sympatho-vagal balance, blood viscosity and inflammation. **Haematologica** 96(11): 1589-1594.

PFAFFL, M. W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic Acids Res** 29(9): e45.

PLATT, O. S. (2000). Sickle cell anemia as an inflammatory disease. **J Clin Invest** 106(3): 337-338.

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

POTOKA, K. P.; GLADWIN, M. T. (2015). Vasculopathy and pulmonary hypertension in sickle cell disease. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol** 308(4): L314-324.

RAMIREZ-RAMIREZ, V.; MACIAS-ISLAS, M. A.; ORTIZ, G. G.; PACHECO-MOISES, F.; TORRES-SANCHEZ, E. D.; SORTO-GOMEZ, T. E.; CRUZ-RAMOS, J. A.; OROZCO-AVINA, G.; CELIS DE LA ROSA, A. J. (2013). Efficacy of fish oil on serum of TNF alpha , IL-1 beta , and IL-6 oxidative stress markers in multiple sclerosis treated with interferon beta-1b. **Oxid Med Cell Longev** 2013: 709493.

SCHRODER, K.; TSCHOPP, J. (2010). The inflammasomes. **Cell** 140(6): 821-832.

STEINBERG, M. H.; MCCARTHY, W. F.; CASTRO, O.; BALLAS, S. K.; ARMSTRONG, F. D.; SMITH, W.; ATAGA, K.; SWERDLOW, P.; KUTLAR, A.; DECASTRO, L.; WACLAWIW, M. A.; INVESTIGATORS OF THE MULTICENTER STUDY OF HYDROXYUREA IN SICKLE CELL, A.; FOLLOW-UP, M. S. H. P. (2010). The risks and benefits of long-term use of hydroxyurea in sickle cell anemia: A 17.5 year follow-up. **Am J Hematol** 85(6): 403-408.

TAS, F.; TILGEN YASASEVER, C.; KARABULUT, S.; TASTEKIN, D.; DURANYILDIZ, D. (2015). Clinical significance of serum interleukin-18 (IL-18) levels in patients with gastric cancer. **Biomed Pharmacother** 70: 19-23.

TAYLOR, J. G. t.; NOLAN, V. G.; MENDELSON, L.; KATO, G. J.; GLADWIN, M. T.; STEINBERG, M. H. (2008). Chronic hyper-hemolysis in sickle cell anemia: association of vascular complications and mortality with less frequent vasoocclusive pain. **PLoS One** 3(5): e2095.

TING, J. P.; LOVERING, R. C.; ALNEMRI, E. S.; BERTIN, J.; BOSS, J. M.; DAVIS, B. K.; FLAVELL, R. A.; GIRARDIN, S. E.; GODZIK, A.; HARTON, J. A.; HOFFMAN, H. M.; HUGOT, J. P.; INOHARA, N.; MACKENZIE, A.; MALTAIS, L. J.; NUNEZ, G.; OGURA, Y.; OTTEN, L. A.; PHILPOTT, D.; REED, J. C.; REITH, W.; SCHREIBER, S.; STEIMLE, V.; WARD, P. A. (2008). The NLR gene family: a standard nomenclature. **Immunity** 28(3): 285-287.

VICARI, P.; ADEGOKE, S. A.; MAZZOTTI, D. R.; CANCADO, R. D.; NOGUTTI, M. A.; FIGUEIREDO, M. S. (2015). Interleukin-1beta and interleukin-6 gene polymorphisms are associated with manifestations of sickle cell anemia. **Blood Cells Mol Dis** 54(3): 244-249.

VILAS-BOAS, W.; CERQUEIRA, B. A.; ZANETTE, A. M.; REIS, M. G.; BARRAL-NETTO, M.; GONCALVES, M. S. (2010). Arginase levels and their association with Th17-related cytokines, soluble adhesion molecules (sICAM-1 and sVCAM-1) and hemolysis markers among steady-state sickle cell anemia patients. **Ann Hematol** 89(9): 877-882.

WEATHERALL, D. J.; PROVAN, A. B. (2000). Red cells I: inherited anaemias. **Lancet** 355(9210): 1169-1175.

WOOD, K. C.; HEBBEL, R. P.; GRANGER, D. N. (2004). Endothelial cell P-selectin mediates a proinflammatory and prothrombotic phenotype in cerebral venules of sickle cell transgenic mice. **Am J Physiol Heart Circ Physiol** 286(5): H1608-1614.

XU, H.; WANDERSEE, N. J.; GUO, Y.; JONES, D. W.; HOLZHAUER, S. L.; HANSON, M. S.; MACHOGU, E.; BROUSSEAU, D. C.; HOGG, N.; DENSMORE, J. C.; KAUL, S.; HILLERY, C. A.; PRITCHARD, K. A., Jr. (2014). Sickle cell disease increases high mobility group box 1: a novel mechanism of inflammation. **Blood** 124(26): 3978-3981.

YERETSSIAN, G. (2012). Effector functions of NLRs in the intestine: innate sensing, cell death, and disease. **Immunol Res** 54(1-3): 25-36.

ZHOU, R.; YAZDI, A. S.; MENU, P.; TSCHOPP, J. (2011). A role for mitochondria in NLRP3 inflammasome activation. **Nature** 469(7329): 221-225.

## Figure Legends

### Figure 1

Nod-like receptor protein 3 (NLRP3; A), Caspase-1 (B), Interleukin (IL) 1 $\beta$  (C) and IL-18 (D) mRNA expression in peripheral blood mononuclear cells (PBMC) of healthy volunteers (AA-PBMC; n = 7) and sickle cell anemia (SCA) patients (SS-PBMC; n = 10). Asterisk marker above each bar represents significant statistic difference between SS-PBMC and AA-PBMC groups (\*p<0.05).

### Figure 2

Nod-like receptor protein 3 (NLRP3; A and B), Caspase-1 (C and D), Interleukin (IL) 1 $\beta$  (E and F) and IL-18 (G and H) mRNA expression in peripheral blood mononuclear cells (PBMC) of healthy volunteers challenged with intact (first column) or lysed (second column) red blood cells of healthy volunteers (AA-RBC; n = 7) or sickle cell anemia patients (SS-RBC; n = 10). Asterisk marker above each bar represents significant statistic difference between this and the negative control bar (PBMC). Asterisk marker above horizontal lines represents significant statistic difference between designated groups (\*p<0.05; \*\*p<0.01).

### Figure 3

Nod-like receptor protein 3 (NLRP3; A and B), Caspase-1 (C and D), Interleukin (IL) 1 $\beta$  (E and F) and IL-18 (G and H) mRNA expression in peripheral blood mononuclear cells (PBMC) of healthy volunteers challenged with intact (first column) or lysed (second column) red blood cells of sickle cell anemia patients (SS-RBC; n = 10), in the presence or absence of hydroxyurea (HU). Asterisk marker above each bar represents significant statistic difference between this and the negative control bar (PBMC). Asterisk marker above horizontal lines represents significant statistic difference between designated groups (\*p<0.05; \*\*p<0.01).

### Figure 4

Levels of Interleukin (IL) 1 $\beta$  (A and B) and IL-18 (C and D) in culture supernatant of peripheral blood mononuclear cells of healthy volunteers (PBMC) incubated with intact (first column) or lysed (second column) red blood cells of healthy volunteers (AA-RBC; n = 7) or sickle cell anemia patients (SS-RBC; n = 10). Asterisk marker

above each bar represents significant statistic difference between this and the negative control bar (PBMC). Asterisk marker above horizontal lines represents significant statistic difference between designated groups (\* $p < 0.05$ ).

### **Figure 5**

Levels of Interleukin (IL) 1 $\beta$  (A and B) and IL-18 (C and D) in culture supernatant of peripheral blood mononuclear cells of healthy volunteers (PBMC) incubated with intact (first column) or lysed (second column) red blood cells of sickle cell anemia patients (SS-RBC;  $n = 10$ ), in the presence or absence of hydroxyurea (HU). Asterisk marker above each bar represents significant statistic difference between this and the negative control bar (PBMC). Asterisk marker above horizontal lines represents significant statistic difference between designated groups (\* $p < 0.05$ ).

Figure 1

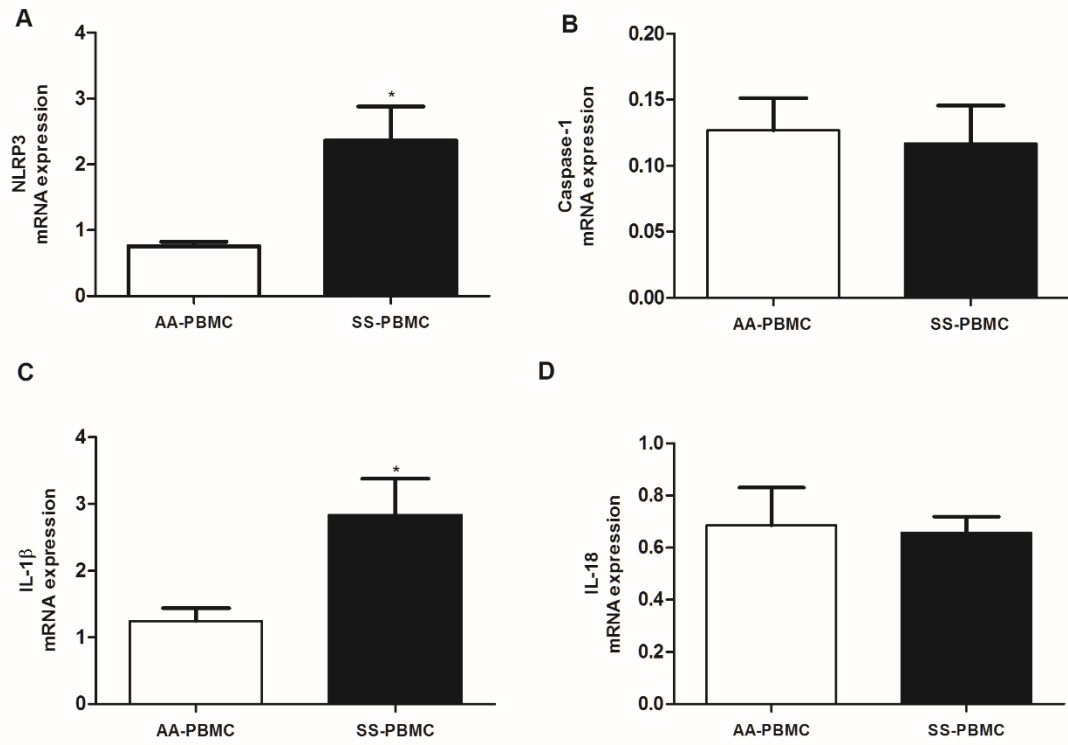


Figure 2

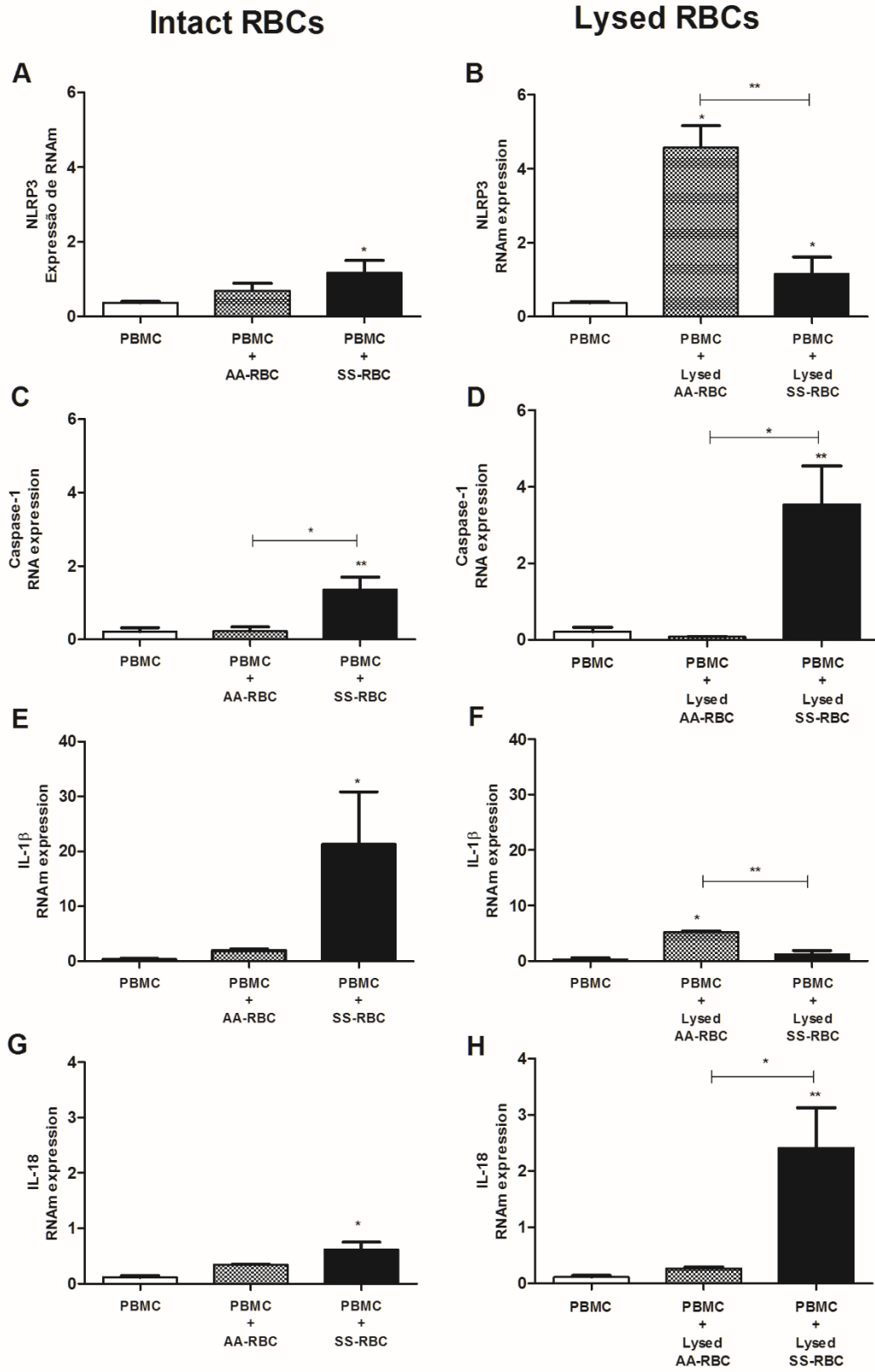


Figure 3

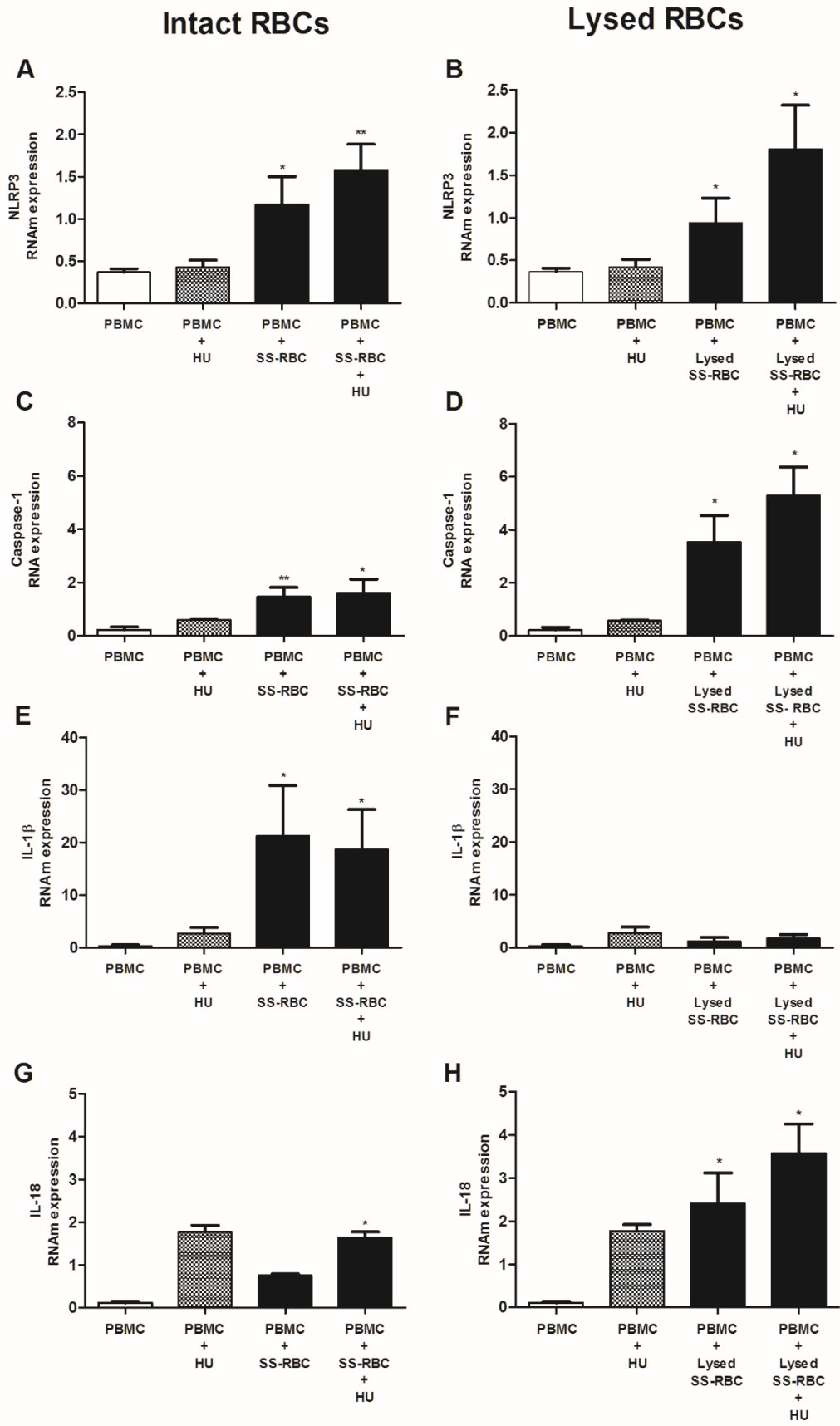




Figure 4

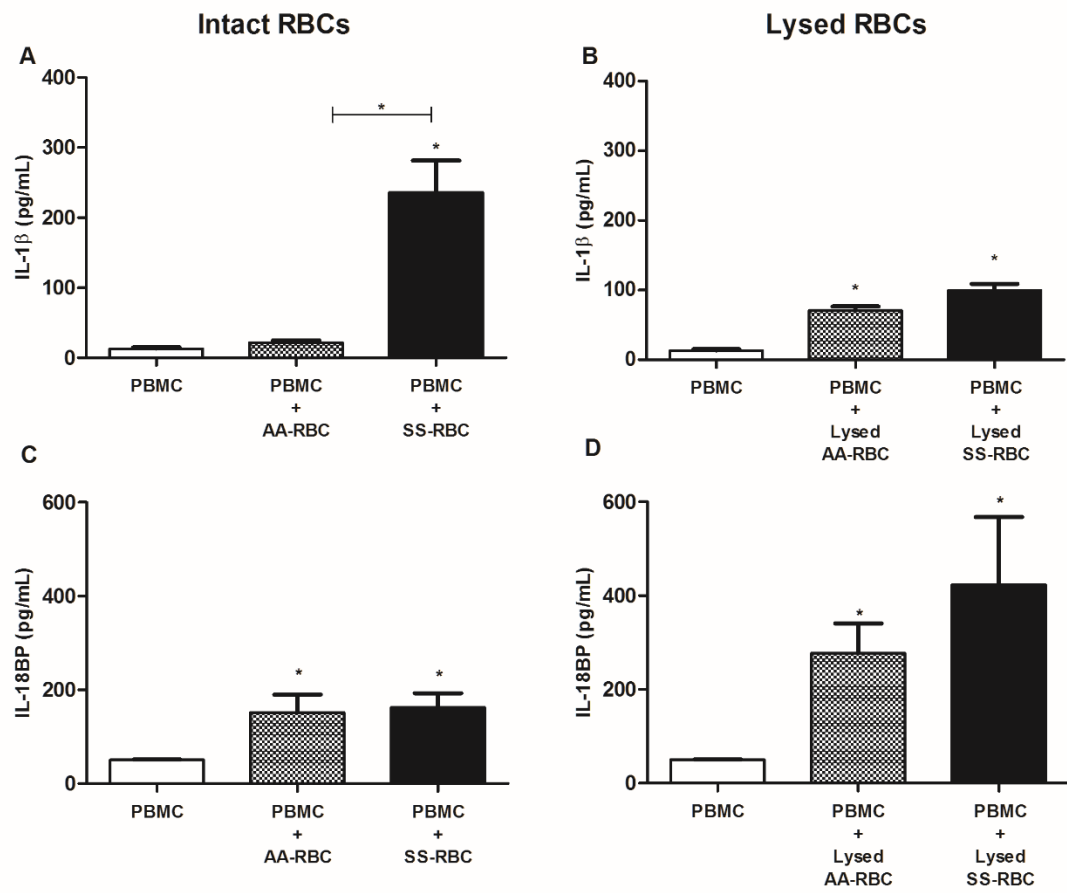
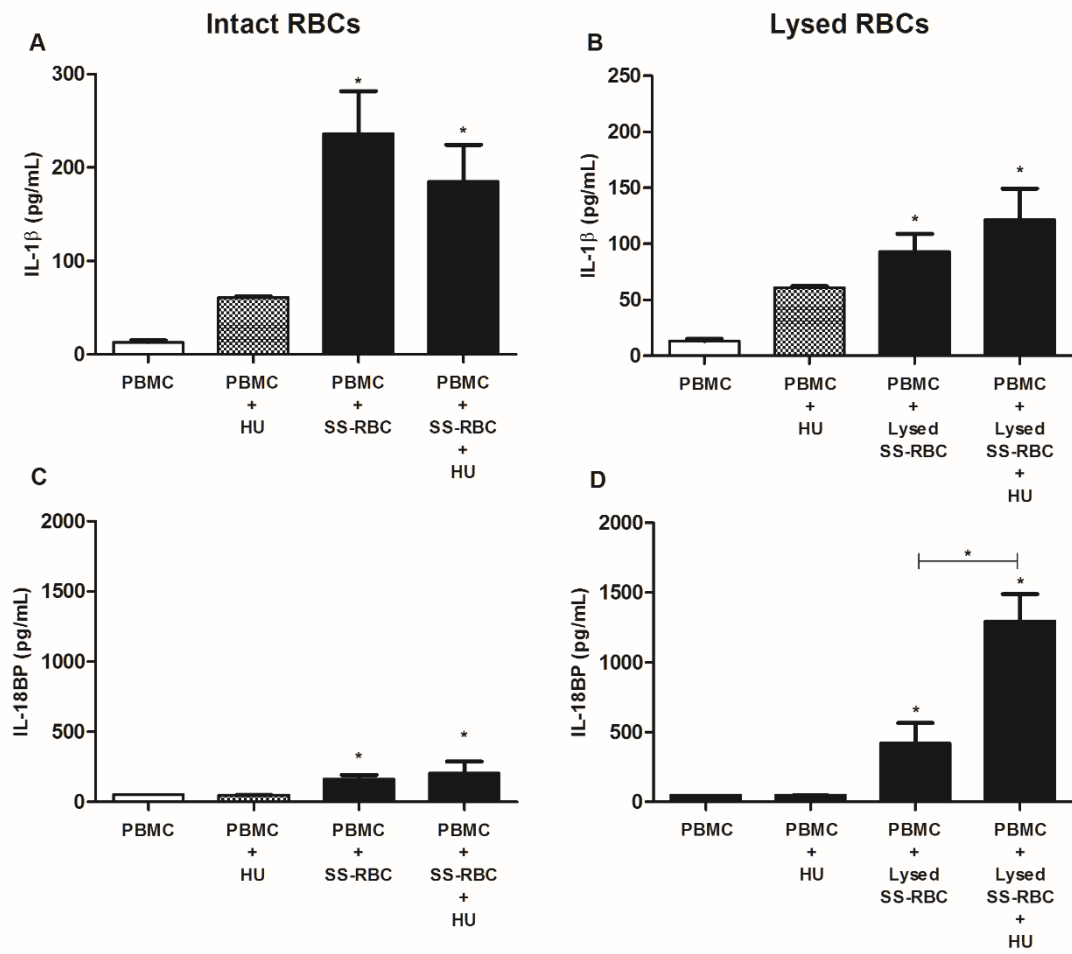


Figure 5



**Table 1** Steady state hematological and biochemical markers values of the SCA patients and healthy volunteers groups.

	<b>SCA patients</b> (n=10) (mean $\pm$ SD)	<b>Healthy volunteers</b> (n=7) (mean $\pm$ SD)	<b>p value</b>
<b>Age (year)</b>	10.33 $\pm$ 4.56	14.50 $\pm$ 5.167	0.1904
<b>RBC (x10<sup>6</sup>/mL)</b>	3.12 $\pm$ 0.34	4.85 $\pm$ 0.46	<b>0.0022</b>
<b>Platelets (x10<sup>9</sup>/mL)</b>	432.00 $\pm$ 135.50	290.30 $\pm$ 43.73	<b>0.0325</b>
<b>Leukocyte (x10<sup>9</sup>/mL)</b>	17033.00 $\pm$ 3695.00	7183.00 $\pm$ 1854.00	<b>0.0022</b>
<b>Reticulocyte (%)</b>	8100.00 $\pm$ 1.99	0.77 $\pm$ 0.20	<b>0.0050</b>
<b>Hemoglobin (g/dL)</b>	9.12 $\pm$ 0.96	13.40 $\pm$ 1.46	<b>0.0048</b>
<b>Fetal Hemoglobin (%)</b>	9.75 $\pm$ 6.86	0.25 $\pm$ 0.08	<b>0.0043</b>
<b>Hematocrit (%)</b>	26.72 $\pm$ 3.35	39.78 $\pm$ 3.56	<b>0.0022</b>
<b>Ferritin (ng/mL)</b>	271.70 $\pm$ 235.3	38.16 $\pm$ 31.67	<b>0.0173</b>
<b>Alpha-1 antitrypsin (mg/dL)</b>	183.00 $\pm$ 22.83	169.50 $\pm$ 43.96	0.7483
<b>Lactate dehydrogenase (U/L)</b>	1474.00 $\pm$ 368.30	308.6 $\pm$ 86.92	<b>0.0043</b>
<b>Aspartate aminotransferase (U/L)</b>	53.00 $\pm$ 18.73	23.40 $\pm$ 9.76	<b>0.0174</b>
<b>Alanine aminotransferase (U/L)</b>	20.67 $\pm$ 7.42	16.80 $\pm$ 5.59	0.5219
<b>C-reactive protein (mg/L)</b>	5.23 $\pm$ 0.94	1.81 $\pm$ 1.45	<b>0.0393</b>

SCA, sickle cell anemia; SD, standard deviation; RBC, red blood cells

\*Mann-Whitney test; values to  $p < 0.05$  were considered a significant difference

**Table 2.** Primer sequences used for qPCR

<b>Gene</b>	<b>Primer (5'→3')</b>
<b><i>CASPASE-1</i></b>	Fw: AAA AAA TCT CAC TGC TTC GGA CAT Rev: TCT GGG CGG TGT GCA AA
<b><i>IL-1<math>\beta</math></i></b>	Fw: AGC TAC GAA TCT CCG ACC AC Rev: CGT TAT CCC ATG TGT CGA AGA A
<b><i>IL-18</i></b>	Fw: ATC GCT TCC TCT CGC AAC A Rev: TCT ACT GGT TCA GCA GCC ATC TT
<b><i>NLRP3</i></b>	Fw: TGC CCC GAC CCA AAC C Rev: GAA GCC GTC CAT GAG GAA GA
<b><i>GAPDH</i></b>	Fw: CAC ATG GCC TCC AAG GAG TAA Rev: TGA GGG TCT CTC TCT TCC TCT TGT
<b><i><math>\beta</math>-ACTINA</i></b>	Fw: CCT GGC ACC CAG CAC AAT Rev: GCC GAT CCA CAC GGA GTA CT

Fw, Forward sequence; Rev, Reverse sequence.

## 7 DISCUSSÃO

A DF é uma desordem hemolítica, caracterizada por um processo inflamatório crônico. A forma mais grave da DF, a AF, apresenta perfil clínico heterogêneo, com ocorrência de crises vaso-oclusivas, AVC, hipertensão pulmonar e STA, entre outras alterações (VILAS-BOAS et al., 2012; PITANGA et al., 2013). As complicações clínicas associadas ao número de internações e óbitos desses pacientes demonstram a necessidade de se investigar moléculas associadas a fisiopatologia da doença bem como alvos terapêuticos.

Nesse sentido, dois polimorfismos genéticos vêm sendo investigados como marcadores prognósticos da DF, e destacam-se quanto à importância na inflamação: *SERPINA1* e *mieloperoxidase (MPO, -463G>A)*. O gene da *SERPINA1* é responsável pelo controle da síntese da AAT, um inibidor de protease produzido, predominantemente, em hepatócitos, a qual atua controlando negativamente citocinas inflamatórias, tais como IL-1, IL-6 e fator de necrose tumoral (TNF), e inibindo elastase neutrofílica (RICHARDS, GAULDIE e BAUMANN, 1991; LOMAS e MAHADEVA, 2002; CHAPPELL et al., 2006). Outra proteína altamente polimórfica é a MPO, que é uma enzima produzida por monócitos e neutrófilos, que atua, principalmente, no estresse oxidativo vascular e proteção do organismo contra bactérias (PITANGA et al., 2014). A presença de polimorfismos nestes dois genes está relacionada a complicações vasculares e aumento da susceptibilidade à infecção nesses pacientes (COSTA et al., 2005; BARBOSA et al., 2014; CARVALHO et al., 2014; STOCKLEY e TURNER, 2014).

No manuscrito I, observamos a prevalência de 56% e 9% do polimorfismo nos genes de MPO e *SERPINA1*, respectivamente, nos pacientes com DF. Embora os polimorfismos não tenham afetado as concentrações de hemoglobina fetal (HbF), o tratamento com hidroxíureia (HU) mostrou melhor resultado para este parâmetro em pacientes com o polimorfismo para MPO ou naqueles sem a mutação para *SERPINA1*.

Durante a crise, pacientes com DF apresentam manifestações clínicas graves, com inflamação sistêmica associada a fenômenos vaso-oclusivos e susceptibilidade aumentada a infecções (WEATHERALL e PROVAN, 2000; TAYLOR et al., 2008). Indivíduos com genótipo selvagem (sem o polimorfismo) para *MPO* e *SERPINA1* estão associados com a manutenção da homeostasia, principalmente na defesa

contra patógenos e durante a inflamação. Nesse sentido, a presença do polimorfismo pode agravar a condição clínica do paciente, como observado em estudos com outras doenças inflamatórias como câncer gástrico e lúpus eritematoso sistêmico (REYNOLDS, STEGEMAN e TERVAERT, 2002; BOUALI et al., 2007; JIANG et al., 2012). Entretanto, não encontramos associação entre os polimorfismos da *MPO* e *SERPINA1* com as manifestações clínicas avaliadas, provavelmente pelo número reduzido de indivíduos que carregam estes polimorfismos aliado à baixa frequência de cada marcador clínico avaliado no grupo estudado.

Está bem documentado que contagens de plaquetas e leucócitos e concentrações de hemoglobina (Hb), HbF e ferritina encontram-se alteradas em pacientes com DF (STEINBERG, 2005; CARVALHO-NETO, LAND e FLEURY, 2011). Entretanto, este é o primeiro trabalho que demonstra a influência dos polimorfismos de *MPO* e *SERPINA1* em parâmetros laboratoriais em pacientes com DF. A presença do polimorfismo não afetou os parâmetros laboratoriais dos voluntários sadios, entretanto, interferiu em alguns marcadores dos pacientes com DF.

A presença do alelo esteve associada a contagem baixa de plaquetas e ao número elevado de leucócitos e linfócitos quando comparados ao grupo selvagem. Plaquetas e leucócitos de pacientes com DF expressam mais moléculas de adesão, contribuindo para a ocorrência de crises vaso-oclusivas e ativação endotelial (BROWNE et al., 1996; OKPALA, 2006; PROENCA-FERREIRA et al., 2010; PROENCA-FERREIRA et al., 2014). Portanto, considerando plaquetas, linfócitos e leucócitos totais, a presença do polimorfismo no gene *MPO* poderia atuar como fator protetor para eventos vaso-oclusivos, embora não tenhamos mostrado no presente trabalho. Esses parâmetros, entretanto, não diferiram entre os grupos selvagem e mutante para a *SERPINA1*.

Em contraste com as análises encontradas para o polimorfismo no gene *MPO*, a mutação no gene da *SERPINA1* mostrou contribuir para o aumento nos níveis de ferritina e, como esperado, redução nos níveis de AAT no grupo de pacientes com DF e com alelos mutantes. A ferritina é um biomarcador da inflamação e seus níveis estão aumentados durante as crises dolorosas e infecção (AL-SAQLADI, BINGADEEM e BRABIN, 2012). Sendo assim, este polimorfismo poderia representar gravidade da doença, especialmente por estar associado a níveis reduzidos de AAT, uma enzima que atua reduzindo a inflamação (GOOPTU, DICKENS e LOMAS,

2014; STOCKLEY e TURNER, 2014). Isso destaca a necessidade de se buscar tratamentos mais específicos e individualizados para pacientes com DF que apresentem esses polimorfismos.

A terapia com HU, o único medicamento aprovado pelo FDA norte americanos, tem mostrado efeitos benéficos nos pacientes com DF. Seu principal mecanismo de ação concentra-se, basicamente, em sua capacidade de inibir a enzima ribonucleotídeo redutase, levando a proliferação eritróide anormal. Sob essa condição, ocorre o aumento da produção de células F, as quais estimulam a síntese de HbF e inibem a síntese de novas moléculas de HbS (FRANCO et al., 2006; STROUSE e HEENEY, 2012). Além disso, a HU melhora o fluxo das hemácias e reduz sua adesão às células vizinhas, reduzindo o risco de crises vaso-oclusivas (KUMKHAEK et al., 2008; PLATT, 2008).

Neste estudo, mostramos que pacientes tratados com HU apresentam níveis elevados de HbF, independentemente de ter ou não o polimorfismo para *SERPINA1* ou *MPO*. Este dado sugere que a presença do polimorfismo não é capaz de afetar a atividade do fármaco, observada na população geral, no que diz respeito à melhora dos níveis da HbF. Por outro lado, a presença do polimorfismo da *MPO* afeta na resposta ao tratamento. Pacientes com esta mutação e tratado com HU apresentaram níveis mais elevados de ferritina do que os indivíduos nas mesmas condições, mas sem a mutação. Neste último, a ausência da mutação implicou em níveis reduzidos desse marcador inflamatório. Este dado sugere que o tratamento com HU em pacientes com DF e com polimorfismo para *MPO* pode piorar o quadro inflamatório, pois a ferritina é um marcador da inflamação.

Além da busca por novos biomarcadores prognósticos da doença, discutidos no trabalho anterior, o sistema imune também vem sendo motivo de muitos estudos (VILAS-BOAS et al., 2012; PITANGA et al., 2013) na busca por uma maior compreensão sobre as vias relacionadas à manutenção da resposta inflamatória em pacientes com AF e, conseqüentemente, por novos alvos terapêuticos. O sistema imune inato atua como primeira linha de defesa contra patógenos, por reconhecer PAMPs e DAMPs derivados da lesão tecidual estéril. Após sua ativação via TLR, a resposta inflamatória é iniciada e mantida enquanto o agente causador estiver presente. Nesse sentido, alguns estudos sugerem que a inflamação na AF pode ser dependente da via do TLR, uma vez que hemácias, ou produtos de hemólise,

poderiam estar sendo reconhecidos como DAMPs (VANCE, ISBERG e PORTNOY, 2009; CERQUEIRA et al., 2011; GUPTA, 2014; CHEN et al., 2015).

No manuscrito II, demonstramos que a expressão de TLRs é ativada em pacientes com AF e que hemácias e HU são capazes de induzir expressão destes receptores. Nós mostramos que células mononucleares (PBMC) de pacientes com AF (SS-PBMC) apresentam expressão aumentada de TLR2, TLR4 e TLR5. O receptor Toll tipo 2 é o mais importante na resposta contra bactérias Gram positivas assim como na inflamação não patogênica, pela interação com DAMPs. Este receptor pode formar um heterodímero com TLR4 o qual é capaz de reconhecer Hb livre (TAKEUCHI et al., 1999; VAN BERGENHENEGOUWEN et al., 2013; WANG et al., 2014). Embora o lipopolissacarídeo (LPS) seja o PAMP mais bem descrito, há outros agonistas em condições estéreis, tais como proteína Box 1 do grupo de alta mobilidade (HMGB1, *high mobility group box 1*), proteína de choque térmico (HSP) e heme (LIEW et al., 2005; BELCHER et al., 2014; GUPTA, 2014).

De maneira semelhante, embora o TLR5 seja importante contra patógenos, há evidências que a expressão aumentada deste receptor está associada a condições inflamatórias, podendo ser um biomarcador de prognóstico ou de gravidade da doença (PIMENTEL-NUNES et al., 2011; WANG et al., 2012; KAUPPILA et al., 2013; SHERIDAN et al., 2013). Desta forma, a expressão destes receptores em PBMC de pacientes com AF poderia estar associado a exposição contínua do conteúdo eritrocitário liberado durante a hemólise intravascular ou pela exposição à própria hemácia falcizada.

A fim de testar esta hipótese, realizamos o experimento em que PBMC de indivíduos sadios foi cultivado com hemácias de pacientes com AF (SS-RBCs) íntegras ou lisadas. Surpreendentemente, embora a expressão do TLR9 tenha sido similar entre PBMC de pacientes e voluntários, as SS-RBCs, íntegras ou lisadas, foram capazes de aumentar a expressão desse receptor em cultura de PBMC de voluntário. As SS-RBCs intactas não induziram, em cultura de PBMC, expressão nos demais receptores (TLR2, TLR4 e TLR5).

O TLR9 é um receptor citoplasmático que se liga ao CpG-DNA (citosina e guanina separadas por apenas um fosfato), o qual é frequente em bactérias e raro em células eucariotas (BAUER, 2013). Além disso, alguns autores sugerem que a hemozoina, um dímero de heme, atua como agonista de TLR9 (COBAN et al., 2010; KALANTARI et al., 2014). Em um modelo experimental de TLR9<sup>-/-</sup>, foi demonstrado



que a inflamação induzida por heme não é dependente desse receptor (FIGUEIREDO et al., 2007). Sendo assim, o aumento da expressão de TLR9, observado neste estudo, foi decorrente de um estímulo diferente do heme. Esta hipótese é baseada na observação de que a expressão de TLR9 foi também aumentada após a adição de SS-RBCs íntegras, situação em que não há heme livre no meio.

É bem conhecido que pacientes com AF apresentam aumento na contagem de reticulócitos, de inclusões citoplasmáticas ricas em DNA chamadas corpúsculos de *Howell-Jolly*, e concentrações elevadas de HbF (STEINBERG, 2005; HARROD et al., 2007; ROGERS et al., 2011). Além disso, a região promotora da globina 5'γ da HbF apresenta concentração elevada de resíduos de CpG-DNA, o qual está ausente nos genes promotores da globina β (SAUNTHARARAJAH, LAVELLE e DESIMONE, 2004; LESSARD et al., 2015).

Desta forma, como CpG-DNA é um agonista TLR9 e, considerando que a expressão deste receptor em cultura de PBMC foi aumentada na presença de SS-RBC, íntegras ou lisadas, e ausente no sistema incubado com AA-RBCs, sugere-se que CpG-DNA liberado de SS-RBCs induz expressão de TLR9, provavelmente por um mecanismo parácrino de retroalimentação positiva.

O conteúdo citoplasmático de AA-RBCs ou SS-RBCs foi capaz de induzir a expressão de TLR2, TLR4 e TLR5, sugerindo que não há diferença significativa em sua composição no que tange esses receptores. Entretanto, a hemólise intravascular ocorre em proporção diminuída em indivíduos sadios, ao passo que a grande proporção desses pacientes exhibe esta condição (TAYLOR et al., 2008; VILAS-BOAS et al., 2010). Portanto, a inflamação observada em pacientes com AF poderia ser consequência da exposição constante do conteúdo intraeritrocitário, tais como heme (BELCHER et al., 2014), durante a hemólise intravascular, a qual leva ao aumento da expressão de TLRs. Adicionalmente, hemólise intravascular induz liberação de HMGB1, uma proteína nuclear envolvida na regulação da transcrição, a qual também atua como DAMP, ativando TLR4 (XU et al., 2014). Neste estudo, mostramos que, em adição ao TLR4, a expressão do TLR2, TLR5 e TLR9 contribui para a condição inflamatória, significando piora na condição clínica do paciente.

Nesse estudo, mostramos que SS-RBCs não foi capaz de induzir a expressão de TLR2; entretanto, o tratamento com HU levou ao aumento significativo desse receptor. O TLR2 está associado à ativação do NF-κB por meio de uma via

dependente de MyD88, o qual leva à produção de citocinas pró-inflamatórias tais como IL-12 e TNF (LIEW et al., 2005). Além disso, demonstramos que HU não reduziu a expressão de TLR4, TLR5 e TLR9, sugerindo que este tratamento, aliado ao que foi encontrado com o TLR2, não é capaz de reduzir a inflamação em pacientes com AF mediada pelo TLR.

Outras moléculas inflamatórias envolvidas na patogênese da AF são LTB4 e metabólitos de NO, tal como nitrito. Demonstramos que SS-RBCs integras induzem produção de LTB4 duas vezes mais do que AA-RBCs, ao passo que SS-RBCs lisadas reduziu este mediador. O tratamento com HU não interferiu neste parâmetro. Como o LTB4 é um eicosanoide associado com a imunopatogênese de doenças inflamatórias tais como AF (SETTY e STUART, 2002; KNIGHT-PERRY et al., 2009), nossos dados sugerem que, assim como observado para TLR, o tratamento com HU não reverte o cenário inflamatório.

Por outro lado, somando à habilidade de SS-RBCs induzirem produção de nitrito na cultura de PBMC, o tratamento com HU foi capaz de reduzir essa produção. Alguns trabalhos vêm mostrando que a HU é um doador de NO (BURKITT e RAAFAT, 2006; VANKAYALA, HARGIS e WOODCOCK, 2012), contribuindo para aumentar as concentrações de NO bioativo. Além disso, sabe-se que a redução dos níveis de nitrito implica em maior concentração de NO bioativo (REITER e GLADWIN, 2003). Portanto, nossos dados sugerem um efeito benéfico do tratamento com HU no que se refere à disponibilidade de NO bioativo, corroborando com outros achados (GLADWIN et al., 2002), uma vez que, em concentrações fisiológicas, o NO está associado à vasodilatação necessária à homeostasia vascular, inibição plaquetária e redução da inflamação.

Outro componente-chave da inflamação é o inflamassoma, uma plataforma molecular que tem como componentes principais os receptores do tipo NOD (NLRs). O mais bem estudado complexo multiproteico do sistema imune inato é o inflamassoma associado a NLRP3, caspase-1 e ASC. Vários “sinais de perigo” têm sido bem documentados por atuar como agonistas do NLRP3-inflamassoma, tais como ATP extracelular, glicose, ácido hialurônico, asbesto e lipoproteína de baixa densidade (LDL) oxidada (SCHRODER e TSCHOPP, 2010; LIU et al., 2014). Mais recentemente, alguns autores têm demonstrado hemácias, ou seu conteúdo citoplasmático como DAMPs para a ativação do NLRP3-inflamassoma, propondo uma nova terminologia, eDAMPs (GLADWIN e OFORI-ACQUAH, 2014; POTOKA e

GLADWIN, 2015). Após a ativação do NLRP3, a caspase-1 torna-se ativa, convertendo pro-IL-1 $\beta$  e pro-IL-18 em suas formas ativas, as quais são secretadas no ambiente extracelular, amplificando a resposta inflamatória (MARIATHASAN e MONACK, 2007).

No terceiro manuscrito, mostramos que NLRP3-inflamassoma é uma plataforma importante da imunidade inata para o reconhecimento de DAMPs derivados de hemácias de pacientes com AF (SS-RBCs) ou do seu conteúdo citoplasmático. O PBMC de pacientes com AF exibem expressão elevada de NLRP3 e IL-1 $\beta$ . Além disso, os SS-RBCs induziram a expressão de caspase-1 e IL-18 e aumentaram a secreção de IL-1 $\beta$ . O tratamento com HU não afetou na expressão de moléculas relacionadas ao NLRP3-inflamassoma, mas aumentou a produção do inibidor de IL-18, IL-18BP (*bind protein*).

Nesse estudo, não encontramos diferença na expressão de caspase-1 e IL-18 entre PBMC de voluntários e de pacientes com AF. Entretanto, PBMC de pacientes com AF expressaram significativamente NLRP3 e IL-1 $\beta$ . Alguns trabalhos mostraram que muitos estímulos induzem expressão de pro-IL-1 $\beta$  e NLRP3, e que IL-18 e caspase-1 são constitutivamente expressos em muitas células (GUARDA et al., 2011; DINARELLO et al., 2013), corroborando com nossos achados.

Interessantemente, as SS-RBCs íntegras foram potentes eDAMPs, pois induziram expressão de todas as moléculas relacionadas ao NLRP3-inflamassoma avaliadas nesse estudo. Além disso, as SS-RBCs lisadas aumentaram a expressão de caspase-1 e IL-18 ao passo que as AA-RBCs lisadas induziram expressão maior de NLRP3 e IL-1 $\beta$ . Estes resultados demonstram que a composição da hemácia do paciente com AF é diferente da do voluntário sadio, no que se refere a eDAMPs agonistas da via do NLRP3- inflamassoma. Portanto, a inflamação observada em pacientes com AF poderia ser consequência da exposição constante a eDAMPs (RBCs íntegras ou lisadas), tais como Hb ou heme (DUTRA et al., 2014), durante a hemólise intravascular, levando ao aumento da expressão de receptores do tipo NOD. A expressão dessas moléculas amplificadoras da resposta inflamatória poderia vir a ser alvo terapêutico para pacientes com AF.

Neste estudo, demonstramos que o tratamento com HU não interfere na expressão de NLRP3, caspase-1, IL-1 $\beta$  e IL-18, sugerindo que o mecanismo de ação da HU não está associado com NLRP3-inflamassoma. Portanto, a HU não é capaz de controlar a inflamação dependente desse sistema.

Além da expressão gênica de moléculas do Inflamassoma, também avaliamos a produção de IL-1 $\beta$  e IL-18BP. A proteína IL-18BP liga-se ao IL-18 prevenindo interação com o seu receptor, contribuindo, dessa forma, para a redução da inflamação (CARBOTTI et al., 2013; DINARELLO et al., 2013). Demonstramos que ambas SS-RBCs, íntegras e lisadas, induziram expressão de IL-1 $\beta$ , ao passo que somente as AA-RBCs lisadas demonstraram essa mesma propriedade. Por outro lado, a produção de IL-18BP foi induzida em todas as condições, sugerindo que sua produção não está associada a algum eDAMP específico de SS-RBCs. Alguns trabalhos têm mostrado que os níveis plasmáticos de IL-18BP encontram-se significativamente elevado em condições inflamatórias (DINARELLO et al., 2003; NOVICK et al., 2010). Em nosso modelo *in vitro*, encontramos expressão gênica aumentada de IL-18 em cultura de PBMC estimulada com SS-RBCs. Entretanto, não encontramos diferença na concentração de IL-18BP em sobrenadante de PBMC estimulado com AA ou SS-RBCs. Na presença de HU, embora não tenha sido observada diferença na expressão de IL-18, esta droga foi capaz de aumentar os níveis de IL-18BP em nosso modelo de hemólise *in vitro*, o que não foi observado usando SS-RBCs íntegras. Portanto, durante a hemólise intravascular, a HU pode ter efeito benéfico no controle da inflamação por reduzir a interação entre IL-18 e seu receptor.

## 8 CONCLUSÃO

Neste estudo, mostramos, pela primeira vez, evidências de que polimorfismos no gene da *MPO* e da *SERPINA1* influenciam nos níveis de marcadores hematológicos e bioquímicos, assim como na resposta ao tratamento com hidroxiureia. Nossos resultados sugerem que o tratamento farmacológico de pacientes com DF deve levar em consideração as alterações genéticas, tais como a presença de polimorfismos gênicos, e considerar a possibilidade de falhas frente a terapia com HU a algumas situações específicas voltadas para estas condições. Como não há nenhuma alternativa terapêutica segura para DF, a maior contribuição deste estudo é chamar a atenção dos médicos para a necessidade de monitoramento de parâmetros laboratoriais, tais como níveis séricos de ferritina e AAT além da contagem de leucócitos, nos pacientes em tratamento com HU.

Outro achado importante desse trabalho é que os resultados obtidos reforçam a hipótese de que RBCs, especialmente, SS-RBCs, e seus produtos de hemólise, podem atuar como eDAMPs. Portanto, nossos dados demonstram que o TLR e NLRP3-inflamassoma podem estar contribuindo para manutenção da resposta inflamatória presente nos pacientes com AF. Esse conhecimento pode levar ao desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas, as quais atuariam em diferentes caminhos daqueles utilizados pela HU, direcionando eDAMPs como alvos terapêuticos.

## REFERÊNCIAS

- ABU-SOUD, H. M.; HAZEN, S. L. Nitric oxide modulates the catalytic activity of myeloperoxidase. **J Biol Chem.** v. 275, n. 8, p. 5425-5430, 2000.
- AGOSTINI, L. et al. NALP3 forms an IL-1beta-processing inflammasome with increased activity in Muckle-Wells autoinflammatory disorder. **Immunity.** v. 20, n. 3, p. 319-325, 2004.
- AL-SAQLADI, A. W.; BIN-GADEEM, H. A.; BRABIN, B. J. Utility of plasma transferrin receptor, ferritin and inflammatory markers in children with sickle cell disease. **Paediatr Int Child Health.** v. 32, n. 1, p. 27-34, 2012.
- ALARD, J. E. et al. TLR2 is one of the endothelial receptors for beta 2-glycoprotein I. **J Immunol.** v. 185, n. 3, p. 1550-1557, 2010.
- ALSHAIBAN, A. et al. Modulation of Sickle Red Blood Cell Adhesion and its Associated Changes in Biomarkers by Sulfated Nonanticoagulant Heparin Derivative. **Clin Appl Thromb Hemost.** 2015.
- ALVARES FILHO, F. et al. [Age and racial geographic distribution of S hemoglobin in Brazil]. **Sangre (Barc).** v. 40, n. 2, p. 97-102, 1995.
- AMER, J. et al. Red blood cells, platelets and polymorphonuclear neutrophils of patients with sickle cell disease exhibit oxidative stress that can be ameliorated by antioxidants. **Br J Haematol.** v. 132, n. 1, p. 108-113, 2006.
- ASARE, K. et al. Plasma interleukin-1beta concentration is associated with stroke in sickle cell disease. **Cytokine.** v. 49, n. 1, p. 39-44, 2010.
- BAHL, N. et al. Delineation of lipopolysaccharide (LPS)-binding sites on hemoglobin: from in silico predictions to biophysical characterization. **J Biol Chem.** v. 286, n. 43, p. 37793-37803, 2011.
- BARBOSA, L. C. et al. Haptoglobin and myeloperoxidase (- G463A) gene polymorphisms in Brazilian sickle cell patients with and without secondary iron overload. **Blood Cells Mol Dis.** v. 52, n. 2-3, p. 95-107, 2014.
- BARRAT, F. J. et al. Nucleic acids of mammalian origin can act as endogenous ligands for Toll-like receptors and may promote systemic lupus erythematosus. **J Exp Med.** v. 202, n. 8, p. 1131-1139, 2005.
- BAUER, S. Toll-like receptor 9 processing: the key event in Toll-like receptor 9 activation? **Immunol Lett.** v. 149, n. 1-2, p. 85-87, 2013.
- BAUERNFEIND, F. et al. Cutting edge: reactive oxygen species inhibitors block priming, but not activation, of the NLRP3 inflammasome. **J Immunol.** v. 187, n. 2, p. 613-617, 2011.
- BAUERNFEIND, F. G. et al. Cutting edge: NF-kappaB activating pattern recognition and cytokine receptors license NLRP3 inflammasome activation by regulating NLRP3 expression. **J Immunol.** v. 183, n. 2, p. 787-791, 2009.
- BELANGER, A. M. et al. Effects of nitric oxide and its congeners on sickle red blood cell deformability. **Transfusion.** 2015.

- BELCHER, J. D. et al. Transgenic sickle mice have vascular inflammation. **Blood**. v. 101, n. 10, p. 3953-3959, 2003.
- 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.
- BELHASSEN, L. et al. Endothelial dysfunction in patients with sickle cell disease is related to selective impairment of shear stress-mediated vasodilation. **Blood**. v. 97, n. 6, p. 1584-1589, 2001.
- BENSOUDA, Y.; LAATIRIS, A. The lyophilization of dispersed systems: influence of freezing process, freezing time, freezing temperature and RBCs concentration on RBCs hemolysis. **Drug Dev Ind Pharm**. v. 32, n. 8, p. 941-945, 2006.
- BERGIN, D. A. et al. alpha-1 Antitrypsin regulates human neutrophil chemotaxis induced by soluble immune complexes and IL-8. **J Clin Invest**. v. 120, n. 12, p. 4236-4250, 2010.
- BERGSBAKEN, T.; FINK, S. L.; COOKSON, B. T. Pyroptosis: host cell death and inflammation. **Nat Rev Microbiol**. v. 7, n. 2, p. 99-109, 2009.
- BERTIN, J. et al. Human CARD4 protein is a novel CED-4/Apaf-1 cell death family member that activates NF-kappaB. **J Biol Chem**. v. 274, n. 19, p. 12955-12958, 1999.
- BODET, C.; CHANDAD, F.; GRENIER, D. Hemoglobin and LPS act in synergy to amplify the inflammatory response. **J Dent Res**. v. 86, n. 9, p. 878-882, 2007.
- BOUALI, H. et al. Association of the G-463A myeloperoxidase gene polymorphism with renal disease in African Americans with systemic lupus erythematosus. **J Rheumatol**. v. 34, n. 10, p. 2028-2034, 2007.
- BRASIL. Manual de Diagnóstico e Tratamento de Doença Falciformes. **Ministério da Saúde** 2001.
- BRASIL. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Especializada. Manual de Educação em Saúde. Linha de cuidado em doença falciforme. **Brasília: Ministério da Saúde**. v. 2, 2009.
- BRASIL. Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas - Doença Falciforme. **Ministério da Saúde. PORTARIA Nº 55**. 2010.
- BROWNE, P. V. et al. Disturbance of plasma and platelet thrombospondin levels in sickle cell disease. **Am J Hematol**. v. 51, n. 4, p. 296-301, 1996.
- BURKITT, M. J.; RAAFAT, A. Nitric oxide generation from hydroxyurea: significance and implications for leukemogenesis in the management of myeloproliferative disorders. **Blood**. v. 107, n. 6, p. 2219-2222, 2006.
- CAI, J. et al. The Role HMGB1 in Cardiovascular Biology: Danger Signals. **Antioxid Redox Signal**. 2015.
- CAJADO, C. et al. TNF-alpha and IL-8: serum levels and gene polymorphisms (-308G>A and -251A>T) are associated with classical biomarkers and medical history in children with sickle cell anemia. **Cytokine**. v. 56, n. 2, p. 312-317, 2011.

CANÇADO, R. D.; JESUS, J. A. A doença falciforme no Brasil. **Rev Bras Hematol Hemoter.** v. 29, n. 3, p. 3, 2007.

CARBOTTI, G. et al. The IL-18 antagonist IL-18-binding protein is produced in the human ovarian cancer microenvironment. **Clin Cancer Res.** v. 19, n. 17, p. 4611-4620, 2013.

CARVALHO-NETO, A.; LAND, M.; FLEURY, M. Clinical and laboratorial aspects in children with sickle cell disease. **RBAC.** v. 43, n. 2, p. 4, 2011.

CARVALHO, M. O. S. et al. Alpha-1 Antitrypsin and SERPINA1 gene Mutation As New Biomarker in Sickle Cell Disease. **Blood** v. 124, n. 21, 2014.

CASCORBI, I. et al. Substantially reduced risk of cancer of the aerodigestive tract in subjects with variant--463A of the myeloperoxidase gene. **Cancer Res.** v. 60, n. 3, p. 644-649, 2000.

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.

CHAAR, V. et al. Aggregation of mononuclear and red blood cells through an  $\alpha_4\beta_1$ -Lu/basal cell adhesion molecule interaction in sickle cell disease. **Haematologica.** v. 95, n. 11, p. 1841-1848, 2010.

CHAPPELL, S. et al. Cryptic haplotypes of SERPINA1 confer susceptibility to chronic obstructive pulmonary disease. **Hum Mutat.** v. 27, n. 1, p. 103-109, 2006.

CHEN, R. et al. Nuclear DAMP complex-mediated RAGE-dependent macrophage cell death. **Biochem Biophys Res Commun.** v. 458, n. 3, p. 650-655, 2015.

CHUANG, T.; ULEVITCH, R. J. Identification of hTLR10: a novel human Toll-like receptor preferentially expressed in immune cells. **Biochim Biophys Acta.** v. 1518, n. 1-2, p. 157-161, 2001.

COBAN, C. et al. Immunogenicity of whole-parasite vaccines against Plasmodium falciparum involves malarial hemozoin and host TLR9. **Cell Host Microbe.** v. 7, n. 1, p. 50-61, 2010.

COKIC, V. P. et al. Hydroxyurea nitrosylates and activates soluble guanylyl cyclase in human erythroid cells. **Blood.** v. 111, n. 3, p. 1117-1123, 2008.

CONNES, P. et al. Haemolysis and abnormal haemorheology in sickle cell anaemia. **Br J Haematol.** v. 165, n. 4, p. 564-572, 2014.

CONRAN, N. et al. Leukocyte numbers correlate with plasma levels of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in sickle cell disease. **Ann Hematol.** v. 86, n. 4, p. 255-261, 2007.

COSTA, R. N. et al. Association of the G-463A myeloperoxidase polymorphism with infection in sickle cell anemia. **Haematologica.** v. 90, n. 7, p. 977-979, 2005.

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.

CUNNINGHAM-MYRIE, C. et al. Hydroxyurea use in prevention of stroke recurrence in children with sickle cell disease in a developing country: A cost effectiveness analysis. **Pediatr Blood Cancer.** 2015.



- DALLY, H. et al. Myeloperoxidase (MPO) genotype and lung cancer histologic types: the MPO -463 A allele is associated with reduced risk for small cell lung cancer in smokers. **Int J Cancer**. v. 102, n. 5, p. 530-535, 2002.
- DE MONTALEMBERT, M. et al. Long-term hydroxyurea treatment in children with sickle cell disease: tolerance and clinical outcomes. **Haematologica**. v. 91, n. 1, p. 125-128, 2006.
- DIEZ, E. et al. Birc1e is the gene within the Lgn1 locus associated with resistance to Legionella pneumophila. **Nat Genet**. v. 33, n. 1, p. 55-60, 2003.
- DINARELLO, C. et al. IL-1 family nomenclature. **Nat Immunol**. v. 11, n. 11, p. 973, 2010.
- DINARELLO, C. A. Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family. **Annu Rev Immunol**. v. 27, p. 519-550, 2009.
- DINARELLO, C. A. Overview of the interleukin-1 family of ligands and receptors. **Semin Immunol**. v. 25, n. 6, p. 389-393, 2013.
- DINARELLO, C. A. et al. Interleukin-18 and IL-18 binding protein. **Front Immunol**. v. 4, n. p. 289, 2013.
- DINARELLO, C. A. et al. Interleukin 18 and interleukin 18 binding protein: possible role in immunosuppression of chronic renal failure. **Blood Purif**. v. 21, n. 3, p. 258-270, 2003.
- DING, A. H.; NATHAN, C. F.; STUEHR, D. J. Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages. Comparison of activating cytokines and evidence for independent production. **J Immunol**. v. 141, n. 7, p. 2407-2412, 1988.
- DOS SANTOS, G.; KUTUZOV, M. A.; RIDGE, K. M. The inflammasome in lung diseases. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol**. v. 303, n. 8, p. L627-633, 2012.
- DUTRA, F. F. et al. Hemolysis-induced lethality involves inflammasome activation by heme. **Proc Natl Acad Sci U S A**. v. 111, n. 39, p. E4110-4118, 2014.
- EBERHARDT, R. T. et al. Sickle cell anemia is associated with reduced nitric oxide bioactivity in peripheral conduit and resistance vessels. **Am J Hematol**. v. 74, n. 2, p. 104-111, 2003.
- EISERICH, J. P. et al. Myeloperoxidase, a leukocyte-derived vascular NO oxidase. **Science**. v. 296, n. 5577, p. 2391-2394, 2002.
- ELIAS, D. B. et al. Correlation of low levels of nitrite and high levels of fetal hemoglobin in patients with sickle cell disease at baseline. **Rev Bras Hematol Hemoter**. v. 34, n. 4, p. 265-269, 2012.
- EMBURY, S. H. The clinical pathophysiology of sickle cell disease. **Annu Rev Med**. v. 37, p. 361-376, 1986.
- ERGUL, S. et al. Vasoactive factors in sickle cell disease: in vitro evidence for endothelin-1-mediated vasoconstriction. **Am J Hematol**. v. 76, n. 3, p. 245-251, 2004.
- FEYLER, A. et al. Point: myeloperoxidase -463G --> a polymorphism and lung cancer risk. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**. v. 11, n. 12, p. 1550-1554, 2002.

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.

FORGIONE, M. A.; LEOPOLD, J. A.; LOSCALZO, J. Roles of endothelial dysfunction in coronary artery disease. **Curr Opin Cardiol.** v. 15, n. 6, p. 409-415, 2000.

FRANCIS, R. B., Jr.; 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.

FRANCO, R. S. et al. The effect of fetal hemoglobin on the survival characteristics of sickle cells. **Blood.** v. 108, n. 3, p. 1073-1076, 2006.

FRENETTE, P. S.; ATWEH, G. F. Sickle cell disease: old discoveries, new concepts, and future promise. **J Clin Invest.** v. 117, n. 4, p. 850-858, 2007.

GALIJASEVIC, S. et al. Myeloperoxidase metabolizes thiocyanate in a reaction driven by nitric oxide. **Biochemistry.** v. 45, n. 4, p. 1255-1262, 2006.

GHONIME, M. G. et al. Inflammasome priming by lipopolysaccharide is dependent upon ERK signaling and proteasome function. **J Immunol.** v. 192, n. 8, p. 3881-3888, 2014.

GHOSH, S. et al. Extracellular hemin crisis triggers acute chest syndrome in sickle mice. **J Clin Invest.** v. 123, n. 11, p. 4809-4820, 2013.

GILL, F. M. et al. Clinical events in the first decade in a cohort of infants with sickle cell disease. Cooperative Study of Sickle Cell Disease. **Blood.** v. 86, n. 2, p. 776-783, 1995.

GLADWIN, M. T.; KATO, G. J. Cardiopulmonary complications of sickle cell disease: role of nitric oxide and hemolytic anemia. **Hematology Am Soc Hematol Educ Program.** p. 51-57, 2005.

GLADWIN, M. T.; OFORI-ACQUAH, S. F. Erythroid DAMPs drive inflammation in SCD. **Blood.** v. 123, n. 24, p. 3689-3690, 2014.

GLADWIN, M. T. et al. Pulmonary hypertension as a risk factor for death in patients with sickle cell disease. **N Engl J Med.** v. 350, n. 9, p. 886-895, 2004.

GLADWIN, M. T. et al. Divergent nitric oxide bioavailability in men and women with sickle cell disease. **Circulation.** v. 107, n. 2, p. 271-278, 2003.

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.

GONCALVES, M. S. et al. BetaS-haplotypes in sickle cell anemia patients from Salvador, Bahia, Northeastern Brazil. **Braz J Med Biol Res.** v. 36, n. 10, p. 1283-1288, 2003.

GOOPTU, B.; DICKENS, J. A.; LOMAS, D. A. The molecular and cellular pathology of alpha(1)-antitrypsin deficiency. **Trends Mol Med.** v. 20, n. 2, p. 116-127, 2014.

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

GRAIDO-GONZALEZ, E. et al. Plasma endothelin-1, cytokine, and prostaglandin E2 levels in sickle cell disease and acute vaso-occlusive sickle crisis. **Blood**. v. 92, n. 7, p. 2551-2555, 1998.

GREEN, N. S.; BARRAL, S. Genetic modifiers of HbF and response to hydroxyurea in sickle cell disease. **Pediatr Blood Cancer**. v. 56, n. 2, p. 177-181, 2011.

GRUBER, R.; NADIR, J.; HAAS, R. Neutrophil elastase activity and concentrations of interleukin 1-beta in crevicular fluid after immediate replacement and immediate loading of implants. **Br J Oral Maxillofac Surg**. v. 48, n. 3, p. 228-231, 2010.

GU, J. M. et al. Endotoxin and thrombin elevate rodent endothelial cell protein C receptor mRNA levels and increase receptor shedding in vivo. **Blood**. v. 95, n. 5, p. 1687-1693, 2000.

GUAN, Z. et al. dNTP deficiency induced by HU via inhibiting ribonucleotide reductase affects neural tube development. **Toxicology**. v. 328, p. 142-151, 2015.

GUARDA, G. et al. Differential expression of NLRP3 among hematopoietic cells. **J Immunol**. v. 186, n. 4, p. 2529-2534, 2011.

GUMA, M. et al. JNK1 controls mast cell degranulation and IL-1{beta} production in inflammatory arthritis. **Proc Natl Acad Sci U S A**. v. 107, n. 51, p. 22122-22127, 2010.

GUPTA, K. HMGB1 takes a "Toll" in sickle cell disease. **Blood**. v. 124, n. 26, p. 3837-3838, 2014.

HANSSON, M.; OLSSON, I.; NAUSEEF, W. M. Biosynthesis, processing, and sorting of human myeloperoxidase. **Arch Biochem Biophys**. v. 445, n. 2, p. 214-224, 2006.

HARROD, V. L. et al. Quantitative analysis of Howell-Jolly bodies in children with sickle cell disease. **Exp Hematol**. v. 35, n. 2, p. 179-183, 2007.

HASSELL, K. L. Population estimates of sickle cell disease in the U.S. **Am J Prev Med**. v. 38, n. 4 Suppl, p. S512-521, 2010.

HEBBEL, R. P. Perspectives series: cell adhesion in vascular biology. Adhesive interactions of sickle erythrocytes with endothelium. **J Clin Invest**. v. 99, n. 11, p. 2561-2564, 1997.

IBE, B. O. et al. Plasma and urinary leukotrienes in sickle cell disease: possible role in the inflammatory process. **Eur J Clin Invest**. v. 24, n. 1, p. 57-64, 1994.

IMAI, Y. et al. Identification of oxidative stress and Toll-like receptor 4 signaling as a key pathway of acute lung injury. **Cell**. v. 133, n. 2, p. 235-249, 2008.

INOHARA, N. et al. Nod1, an Apaf-1-like activator of caspase-9 and nuclear factor-kappaB. **J Biol Chem**. v. 274, n. 21, p. 14560-14567, 1999.

JANCIAUSKIENE, S. M.; NITA, I. M.; STEVENS, T. Alpha1-antitrypsin, old dog, new tricks. Alpha1-antitrypsin exerts in vitro anti-inflammatory activity in human monocytes by elevating cAMP. **J Biol Chem**. v. 282, n. 12, p. 8573-8582, 2007.

JESUS, A. A.; GOLDBACH-MANSKY, R. IL-1 blockade in autoinflammatory syndromes. **Annu Rev Med**. v. 65, p. 223-244, 2014.

JIANG, Z. et al. Association of the 463G-A myeloperoxidase gene polymorphism with gastric cancer risk. **Hepatogastroenterology**. v. 59, n. 115, p. 757-761, 2012.

KALANTARI, P. et al. Dual engagement of the NLRP3 and AIM2 inflammasomes by plasmodium-derived hemozoin and DNA during malaria. **Cell Rep**. v. 6, n. 1, p. 196-210, 2014.

KATO, G. J.; GLADWIN, M. T.; STEINBERG, M. H. 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.

KAUPPILA, J. H. et al. Toll-like receptor 5 (TLR5) expression is a novel predictive marker for recurrence and survival in squamous cell carcinoma of the tongue. **Br J Cancer**. v. 108, n. 3, p. 638-643, 2013.

KAYSEROVA, J. et al. Decreased dendritic cell numbers but increased TLR9-mediated interferon-alpha production in first degree relatives of type 1 diabetes patients. **Clin Immunol**. v. 153, n. 1, p. 49-55, 2014.

KETELUT-CARNEIRO, N. et al. IL-18 Triggered by the Nlrp3 Inflammasome Induces Host Innate Resistance in a Pulmonary Model of Fungal Infection. **J Immunol**. 2015.

KIM, W. Y. et al. Increased expression of Toll-like receptor 5 during progression of cervical neoplasia. **Int J Gynecol Cancer**. v. 18, n. 2, p. 300-305, 2008.

KITAZAWA, M. et al. Blocking IL-1 signaling rescues cognition, attenuates tau pathology, and restores neuronal beta-catenin pathway function in an Alzheimer's disease model. **J Immunol**. v. 187, n. 12, p. 6539-6549, 2011.

KLEBANOFF, S. J. Myeloperoxidase: contribution to the microbicidal activity of intact leukocytes. **Science**. v. 169, n. 3950, p. 1095-1097, 1970.

KNIGHT-PERRY, J. et al. Leukotriene pathway in sickle cell disease: a potential target for directed therapy. **Expert Rev Hematol**. v. 2, n. 1, p. 57-68, 2009.

KUMAR, R. et al. Enhanced expression of Toll-like receptors 2 and 4, but not 9, in spleen tissue from patients with visceral leishmaniasis. **Parasite Immunol**. v. 36, n. 12, p. 721-725, 2014.

KUMKHAEK, C. et al. Fetal haemoglobin response to hydroxycarbamide treatment and sar1a promoter polymorphisms in sickle cell anaemia. **Br J Haematol**. v. 141, n. 2, p. 254-259, 2008.

LARD, L. R. et al. Neutrophil activation in sickle cell disease. **J Leukoc Biol**. v. 66, n. 3, p. 411-415, 1999.

LATZ, E.; XIAO, T. S.; STUTZ, A. Activation and regulation of the inflammasomes. **Nat Rev Immunol**. v. 13, n. 6, p. 397-411, 2013.

LEADBETTER, E. A. et al. Chromatin-IgG complexes activate B cells by dual engagement of IgM and Toll-like receptors. **Nature**. v. 416, n. 6881, p. 603-607, 2002.

LEBENSBURGER, J. D. et al. Hydroxyurea therapy requires HbF induction for clinical benefit in a sickle cell mouse model. **Haematologica**. v. 95, n. 9, p. 1599-1603, 2010.

LEFEBVRE, J. S. et al. Extra domain A of fibronectin primes leukotriene biosynthesis and stimulates neutrophil migration through activation of Toll-like receptor 4. **Arthritis Rheum**. v. 63, n. 6, p. 1527-1533, 2011.

LESSARD, S. et al. Comparison of DNA methylation profiles in human fetal and adult red blood cell progenitors. **Genome Med**. v. 7, n. 1, p. 1, 2015.

LIEW, F. Y. et al. Negative regulation of toll-like receptor-mediated immune responses. **Nat Rev Immunol**. v. 5, n. 6, p. 446-458, 2005.

LIGHTFIELD, K. L. et al. Critical function for Naip5 in inflammasome activation by a conserved carboxy-terminal domain of flagellin. **Nat Immunol**. v. 9, n. 10, p. 1171-1178, 2008.

LIN, T. et al. Synergistic inflammation is induced by blood degradation products with microbial Toll-like receptor agonists and is blocked by hemopexin. **J Infect Dis**. v. 202, n. 4, p. 624-632, 2010.

LIU, S. et al. TLR2 is a primary receptor for Alzheimer's amyloid beta peptide to trigger neuroinflammatory activation. **J Immunol**. v. 188, n. 3, p. 1098-1107, 2012.

LIU, W. et al. OxLDL-induced IL-1 beta secretion promoting foam cells formation was mainly via CD36 mediated ROS production leading to NLRP3 inflammasome activation. **Inflamm Res**. v. 63, n. 1, p. 33-43, 2014.

LOMAS, D. A.; MAHADEVA, R. Alpha1-antitrypsin polymerization and the serpinopathies: pathobiology and prospects for therapy. **J Clin Invest**. v. 110, n. 11, p. 1585-1590, 2002.

LONDON, S. J.; LEHMAN, T. A.; TAYLOR, J. A. Myeloperoxidase genetic polymorphism and lung cancer risk. **Cancer Res**. v. 57, n. 22, p. 5001-5003, 1997.

LOUREIRO, M. M.; ROZENFELD, S. [Epidemiology of sickle cell disease hospital admissions in Brazil]. **Rev Saude Publica**. v. 39, n. 6, p. 943-949, 2005.

LU, Y. et al. Therapeutic level of functional human alpha 1 antitrypsin (hAAT) secreted from murine muscle transduced by adeno-associated virus (rAAV1) vector. **J Gene Med**. v. 8, n. 6, p. 730-735, 2006.

LUCOTTE, G.; SESBOUE, R. Polymerase chain reaction detection of S and Z alpha-1-antitrypsin variants by duplex PCR assay. **Mol Cell Probes**. v. 13, n. 5, p. 389-391, 1999.

LYN-COOK, B. D. et al. Increased expression of Toll-like receptors (TLRs) 7 and 9 and other cytokines in systemic lupus erythematosus (SLE) patients: ethnic differences and potential new targets for therapeutic drugs. **Mol Immunol**. v. 61, n. 1, p. 38-43, 2014.

MARIATHASAN, S.; MONACK, D. M. Inflammasome adaptors and sensors: intracellular regulators of infection and inflammation. **Nat Rev Immunol**. v. 7, n. 1, p. 31-40, 2007.

MARTINON, F.; BURNS, K.; TSCHOPP, J. The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL-beta. **Mol Cell**. v. 10, n. 2, p. 417-426, 2002.

- MARTINON, F. et al. Gout-associated uric acid crystals activate the NALP3 inflammasome. **Nature**. v. 440, n. 7081, p. 237-241, 2006.
- MEDZHITOV, R.; PRESTON-HURLBURT, P.; JANEWAY, C. A., Jr. A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity. **Nature**. v. 388, n. 6640, p. 394-397, 1997.
- MONTEIRO, A. P. et al. Leukotriene B4 mediates neutrophil migration induced by heme. **J Immunol**. v. 186, n. 11, p. 6562-6567, 2011.
- MORRIS, C. R. Mechanisms of vasculopathy in sickle cell disease and thalassemia. **Hematology Am Soc Hematol Educ Program**. p. 177-185, 2008.
- MORRIS, C. R. et al. Erythrocyte glutamine depletion, altered redox environment, and pulmonary hypertension in sickle cell disease. **Blood**. v. 111, n. 1, p. 402-410, 2008.
- MORRIS, C. R. et al. Hydroxyurea and arginine therapy: impact on nitric oxide production in sickle cell disease. **J Pediatr Hematol Oncol**. v. 25, n. 8, p. 629-634, 2003.
- MTATIRO, S. N. et al. Genetic variants at HbF-modifier loci moderate anemia and leukocytosis in sickle cell disease in Tanzania. **Am J Hematol**. v. 90, n. 1, p. E1-4, 2015.
- NAHAVANDI, M. et al. Nitric oxide and cyclic GMP levels in sickle cell patients receiving hydroxyurea. **Br J Haematol**. v. 119, n. 3, p. 855-857, 2002.
- NAIR, A. R. et al. Angiotensin II-induced hypertensive renal inflammation is mediated through HMGB1-TLR4 signaling in rat tubulo-epithelial cells. **Exp Cell Res**. n. 2015.
- NATHAN, D. G. et al. Sickle cell disease (SCD), iNKT cells, and regadenoson infusion. **Trans Am Clin Climatol Assoc**. v. 123, n. p. 312-317; discussion 317-318, 2012.
- NEBOR, D. et al. Frequency of pain crises in sickle cell anemia and its relationship with the sympatho-vagal balance, blood viscosity and inflammation. **Haematologica**. v. 96, n. 11, p. 1589-1594, 2011.
- NICKERSON, K. et al. Dendritic cell-specific MHC class II transactivator contains a caspase recruitment domain that confers potent transactivation activity. **J Biol Chem**. v. 276, n. 22, p. 19089-19093, 2001.
- NOVICK, D. et al. High circulating levels of free interleukin-18 in patients with active SLE in the presence of elevated levels of interleukin-18 binding protein. **J Autoimmun**. v. 34, n. 2, p. 121-126, 2010.
- ODIEVRE, M. H. et al. Pathophysiological insights in sickle cell disease. **Indian J Med Res**. v. 134, p. 532-537, 2011.
- OKPALA, I. Leukocyte adhesion and the pathophysiology of sickle cell disease. **Curr Opin Hematol**. v. 13, n. 1, p. 40-44, 2006.
- OPENE, M. et al. Sickle erythrocytes and platelets augment lung leukotriene synthesis with downregulation of anti-inflammatory proteins: relevance in the pathology of the acute chest syndrome. **Pulm Circ**. v. 4, n. 3, p. 482-495, 2014.

OSTERMAN GOLKAR, S. et al. Intracellular deoxyribonucleotide pool imbalance and DNA damage in cells treated with hydroxyurea, an inhibitor of ribonucleotide reductase. **Mutagenesis**. v. 28, n. 6, p. 653-660, 2013.

OZINSKY, A. et al. The repertoire for pattern recognition of pathogens by the innate immune system is defined by cooperation between toll-like receptors. **Proc Natl Acad Sci U S A**. v. 97, n. 25, p. 13766-13771, 2000.

PECOITS-FILHO, R. et al. A functional variant of the myeloperoxidase gene is associated with cardiovascular disease in end-stage renal disease patients. **Kidney Int Suppl**. n. 84, p. S172-176, 2003.

PFAFFL, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic Acids Res**. v. 29, n. 9, p. e45, 2001.

PHILPOTT, D. J. et al. NOD proteins: regulators of inflammation in health and disease. **Nat Rev Immunol**. v. 14, n. 1, p. 9-23, 2014.

PIEDRAFITA, F. J. et al. An Alu element in the myeloperoxidase promoter contains a composite SP1-thyroid hormone-retinoic acid response element. **J Biol Chem**. v. 271, n. 24, p. 14412-14420, 1996.

PIMENTEL-NUNES, P. et al. Increased expression of toll-like receptors (TLR) 2, 4 and 5 in gastric dysplasia. **Pathol Oncol Res**. v. 17, n. 3, p. 677-683, 2011.

PITANGA, T. N. et al. Neutrophil-derived microparticles induce myeloperoxidase-mediated damage of vascular endothelial cells. **BMC Cell Biol**. v. 15, n. p. 21, 2014.

PITANGA, T. N. et al. Cytokine profiles in sickle cell anemia: Pathways to be unveiled. **Adv Biosc Biotech**. v. 4, n. 7, p. 7, 2013.

PLATT, O. S. Sickle cell anemia as an inflammatory disease. **J Clin Invest**. v. 106, n. 3, p. 337-338, 2000.

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

POTOKA, K. P.; GLADWIN, M. T. Vasculopathy and pulmonary hypertension in sickle cell disease. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol**. v. 308, n. 4, p. L314-324, 2015.

POTT, G. B. et al. Alpha-1-antitrypsin is an endogenous inhibitor of proinflammatory cytokine production in whole blood. **J Leukoc Biol**. v. 85, n. 5, p. 886-895, 2009.

PROENCA-FERREIRA, R. et al. Endothelial activation by platelets from sickle cell anemia patients. **PLoS One**. v. 9, n. 2, p. e89012, 2014.

PROENCA-FERREIRA, R. et al. Increased adhesive properties of platelets in sickle cell disease: roles for alphaIIb beta3-mediated ligand binding, diminished cAMP signalling and increased phosphodiesterase 3A activity. **Br J Haematol**. v. 149, n. 2, p. 280-288, 2010.

PROKOPOWICZ, Z. et al. Neutrophil myeloperoxidase: soldier and statesman. **Arch Immunol Ther Exp (Warsz)**. v. 60, n. 1, p. 43-54, 2012.

PUREN, A. J.; FANTUZZI, G.; DINARELLO, C. A. Gene expression, synthesis, and secretion of interleukin 18 and interleukin 1beta are differentially regulated in human blood mononuclear cells and mouse spleen cells. **Proc Natl Acad Sci U S A**. v. 96, n. 5, p. 2256-2261, 1999.

QING, D. Y. et al. Red blood cells induce necroptosis of lung endothelial cells and increase susceptibility to lung inflammation. **Am J Respir Crit Care Med**. v. 190, n. 11, p. 1243-1254, 2014.

RAAT, N. J. et al. Direct sGC activation bypasses NO scavenging reactions of intravascular free oxy-hemoglobin and limits vasoconstriction. **Antioxid Redox Signal**. v. 19, n. 18, p. 2232-2243, 2013.

RAMIREZ-RAMIREZ, V. et al. Efficacy of fish oil on serum of TNF alpha , IL-1 beta , and IL-6 oxidative stress markers in multiple sclerosis treated with interferon beta-1b. **Oxid Med Cell Longev**. v. 2013, p. 709493, 2013.

RAPHAEL, R. I. Pathophysiology and treatment of sickle cell disease. **Clin Adv Hematol Oncol**. v. 3, n. 6, p. 492-505, 2005.

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

REES, D. C.; WILLIAMS, T. N.; GLADWIN, M. T. Sickle-cell disease. **Lancet**. v. 376, n. 9757, p. 2018-2031, 2010.

REGAN, T. et al. Identification of TLR10 as a key mediator of the inflammatory response to *Listeria monocytogenes* in intestinal epithelial cells and macrophages. **J Immunol**. v. 191, n. 12, p. 6084-6092, 2013.

REITER, C. D.; GLADWIN, M. T. An emerging role for nitric oxide in sickle cell disease vascular homeostasis and therapy. **Curr Opin Hematol**. v. 10, n. 2, p. 99-107, 2003.

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.

REYNOLDS, W. F. et al. Myeloperoxidase promoter polymorphism -463G is associated with more severe clinical expression of cystic fibrosis pulmonary disease. **Mediators Inflamm**. v. 2006, n. 2, p. 36735, 2006.

REYNOLDS, W. F.; STEGEMAN, C. A.; TERVAERT, J. W. -463 G/A myeloperoxidase promoter polymorphism is associated with clinical manifestations and the course of disease in MPO-ANCA-associated vasculitis. **Clin Immunol**. v. 103, n. 2, p. 154-160, 2002.

RICCIARDI-CASTAGNOLI, P.; GRANUCCI, F. Opinion: Interpretation of the complexity of innate immune responses by functional genomics. **Nat Rev Immunol**. v. 2, n. 11, p. 881-889, 2002.

RICHARDS, C.; GAULDIE, J.; BAUMANN, H. Cytokine control of acute phase protein expression. **Eur Cytokine Netw**. v. 2, n. 2, p. 89-98, 1991.

RODRIGUEZ, S.; GAUNT, T. R.; DAY, I. N. Hardy-Weinberg equilibrium testing of biological ascertainment for Mendelian randomization studies. **Am J Epidemiol**. v. 169, n. 4, p. 505-514, 2009.

ROGERS, Z. R. et al. Biomarkers of splenic function in infants with sickle cell anemia: baseline data from the BABY HUG Trial. **Blood**. v. 117, n. 9, p. 2614-2617, 2011.



- ROMERO, J. R. et al. Arginine supplementation of sickle transgenic mice reduces red cell density and Gardos channel activity. **Blood**. v. 99, n. 4, p. 1103-1108, 2002.
- ROTHER, R. P. et al. The clinical sequelae of intravascular hemolysis and extracellular plasma hemoglobin: a novel mechanism of human disease. **JAMA**. v. 293, n. 13, p. 1653-1662, 2005.
- RUDNICK, D. A.; PERLMUTTER, D. H. Alpha-1-antitrypsin deficiency: a new paradigm for hepatocellular carcinoma in genetic liver disease. **Hepatology**. v. 42, n. 3, p. 514-521, 2005.
- SAUNTHARARAJAH, Y.; LAVELLE, D.; DESIMONE, J. DNA hypo-methylating agents and sickle cell disease. **Br J Haematol**. v. 126, n. 5, p. 629-636, 2004.
- SCHNOG, J. B. et al. Sickle cell disease; a general overview. **Neth J Med**. v. 62, n. 10, p. 364-374, 2004.
- SCHRODER, K.; TSCHOPP, J. The inflammasomes. **Cell**. v. 140, n. 6, p. 821-832, 2010.
- SEGEL, G. B.; HALTERMAN, M. W.; LICHTMAN, M. A. The paradox of the neutrophil's role in tissue injury. **J Leukoc Biol**. v. 89, n. 3, p. 359-372, 2010.
- SETTY, B. N.; KULKARNI, S.; STUART, M. J. Role of erythrocyte phosphatidylserine in sickle red cell-endothelial adhesion. **Blood**. v. 99, n. 5, p. 1564-1571, 2002.
- SETTY, B. N.; STUART, M. J. Eicosanoids in sickle cell disease: potential relevance of neutrophil leukotriene B4 to disease pathophysiology. **J Lab Clin Med**. v. 139, n. 2, p. 80-89, 2002.
- SHAEIB, F. et al. Melatonin prevents myeloperoxidase heme destruction and the generation of free iron mediated by self-generated hypochlorous Acid. **PLoS One**. v. 10, n. 3, p. e0120737, 2015.
- SHERIDAN, J. et al. A non-synonymous coding variant (L616F) in the TLR5 gene is potentially associated with Crohn's disease and influences responses to bacterial flagellin. **PLoS One**. v. 8, n. 4, p. e61326, 2013.
- SHETH, S.; LICURSI, M.; BHATIA, M. Sickle cell disease: time for a closer look at treatment options? **Br J Haematol**. v. 162, n. 4, p. 455-464, 2013.
- SHIKHAGAIE, M. M. et al. Mapping of TLR5 and TLR7 in central and distal human airways and identification of reduced TLR expression in severe asthma. **Clin Exp Allergy**. v. 44, n. 2, p. 184-196, 2014.
- SILVA, L. B.; GONCALVES, R. P.; MARTINS, M. F. Estudo da correlação entre os níveis de hemoglobina fetal e o prognóstico dos pacientes com anemia falciforme. **Rev Bras Hematol Hemoter**. v. 31, n. 6, 2004.
- SILVA, W. S. et al. Avaliação da cobertura do programa de triagem neonatal de hemoglobinopatias em populações do Recôncavo Baiano, Brasil. **Cad. Saúde Pública**. v. 22, n. 12, 2006.
- SMITH, P. D. et al. Cytomegalovirus enhances macrophage TLR expression and MyD88-mediated signal transduction to potentiate inducible inflammatory responses. **J Immunol**. v. 193, n. 11, p. 5604-5612, 2014.

SOLOVEY, A. et al. Endothelial nitric oxide synthase and nitric oxide regulate endothelial tissue factor expression in vivo in the sickle transgenic mouse. **Am J Hematol.** v. 85, n. 1, p. 41-45, 2010.

STEINBERG, M. H. Predicting clinical severity in sickle cell anaemia. **Br J Haematol.** v. 129, n. 4, p. 465-481, 2005.

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

STEINBERG, M. H.; BRUGNARA, C. Pathophysiological-based approaches to treatment of sickle cell disease. **Annu Rev Med.** v. 54, p. 89-112, 2003.

STEINBERG, M. H. et al. The risks and benefits of long-term use of hydroxyurea in sickle cell anemia: A 17.5 year follow-up. **Am J Hematol.** v. 85, n. 6, p. 403-408, 2010.

STEINBERG, M. H.; RODGERS, G. P. Pathophysiology of sickle cell disease: role of cellular and genetic modifiers. **Semin Hematol.** v. 38, n. 4, p. 299-306, 2001.

STOCKLEY, R. A. Alpha1-antitrypsin review. **Clin Chest Med.** v. 35, n. 1, p. 39-50, 2014.

STOCKLEY, R. A.; TURNER, A. M. alpha-1-Antitrypsin deficiency: clinical variability, assessment, and treatment. **Trends Mol Med.** v. 20, n. 2, p. 105-115, 2014.

STROUSE, J. J.; HEENEY, M. M. Hydroxyurea for the treatment of sickle cell disease: efficacy, barriers, toxicity, and management in children. **Pediatr Blood Cancer.** v. 59, n. 2, p. 365-371, 2012.

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

SWITZER, J. A. et al. Pathophysiology and treatment of stroke in sickle-cell disease: present and future. **Lancet Neurol.** v. 5, n. 6, p. 501-512, 2006.

TAKEDA, K.; AKIRA, S. TLR signaling pathways. **Semin Immunol.** v. 16, n. 1, p. 3-9, 2004.

TAKEUCHI, O. et al. Differential roles of TLR2 and TLR4 in recognition of gram-negative and gram-positive bacterial cell wall components. **Immunity.** v. 11, n. 4, p. 443-451, 1999.

TAS, F. et al. Clinical significance of serum interleukin-18 (IL-18) levels in patients with gastric cancer. **Biomed Pharmacother.** v. 70, p. 19-23, 2015.

TAYLOR, J. G. t. et al. Chronic hyper-hemolysis in sickle cell anemia: association of vascular complications and mortality with less frequent vasoocclusive pain. **PLoS One.** v. 3, n. 5, p. e2095, 2008.

TELEN, M. J. Erythrocyte adhesion receptors: blood group antigens and related molecules. **Transfus Med Rev.** v. 19, n. 1, p. 32-44, 2005.

THUN, G. A. et al. Causal and synthetic associations of variants in the SERPINA gene cluster with alpha1-antitrypsin serum levels. **PLoS Genet.** v. 9, n. 8, p. e1003585, 2013.

TING, J. P. et al. The NLR gene family: a standard nomenclature. **Immunity.** v. 28, n. 3, p. 285-287, 2008.

- TOMLINSON, G. et al. TLR-mediated inflammatory responses to *Streptococcus pneumoniae* are highly dependent on surface expression of bacterial lipoproteins. **J Immunol.** v. 193, n. 7, p. 3736-3745, 2014.
- TURHAN, A. et al. Primary role for adherent leukocytes in sickle cell vascular occlusion: a new paradigm. **Proc Natl Acad Sci U S A.** v. 99, n. 5, p. 3047-3051, 2002.
- TURINO, G. M. et al. Clinical features of individuals with PI\*SZ phenotype of alpha 1-antitrypsin deficiency. alpha 1-Antitrypsin Deficiency Registry Study Group. **Am J Respir Crit Care Med.** v. 154, n. 6 Pt 1, p. 1718-1725, 1996.
- VAN BEERS, E. J. et al. Iron, inflammation, and early death in adults with sickle cell disease. **Circ Res.** v. 116, n. 2, p. 298-306, 2015.
- VAN BERGENHENEGOUWEN, J. et al. TLR2 & Co: a critical analysis of the complex interactions between TLR2 and coreceptors. **J Leukoc Biol.** v. 94, n. 5, p. 885-902, 2013.
- VANCE, R. E.; ISBERG, R. R.; PORTNOY, D. A. Patterns of pathogenesis: discrimination of pathogenic and nonpathogenic microbes by the innate immune system. **Cell Host Microbe.** v. 6, n. 1, p. 10-21, 2009.
- VANKAYALA, S. L.; HARGIS, J. C.; WOODCOCK, H. L. Unlocking the binding and reaction mechanism of hydroxyurea substrates as biological nitric oxide donors. **J Chem Inf Model.** v. 52, n. 5, p. 1288-1297, 2012.
- VICARI, P. et al. Interleukin-1beta and interleukin-6 gene polymorphisms are associated with manifestations of sickle cell anemia. **Blood Cells Mol Dis.** v. 54, n. 3, p. 244-249, 2015.
- VILAS-BOAS, W. et al. Sickle cell disease: Only one road, but different pathways for inflammation. **Adv Biosc Biotech.** v. 3, n. 4, p. 13, 2012.
- VILAS-BOAS, W. et al. Arginase levels and their association with Th17-related cytokines, soluble adhesion molecules (sICAM-1 and sVCAM-1) and hemolysis markers among steady-state sickle cell anemia patients. **Ann Hematol.** v. 89, n. 9, p. 877-882, 2010.
- VILLAESCUSA, R. et al. [Antineutrophil cytoplasmic antibodies in patients with sickle cell anemia]. **Sangre (Barc).** v. 44, n. 5, p. 383-385, 1999.
- WAGENER, J. et al. Fungal chitin dampens inflammation through IL-10 induction mediated by NOD2 and TLR9 activation. **PLoS Pathog.** v. 10, n. 4, p. e1004050, 2014.
- WANG, R. et al. Airway epithelial expression of TLR5 is downregulated in healthy smokers and smokers with chronic obstructive pulmonary disease. **J Immunol.** v. 189, n. 5, p. 2217-2225, 2012.
- WANG, Y. C. et al. Toll-like receptor 2/4 heterodimer mediates inflammatory injury in intracerebral hemorrhage. **Ann Neurol.** v. 75, n. 6, p. 876-889, 2014.
- WEATHERALL, D. J.; CLEGG, J. B. Inherited haemoglobin disorders: an increasing global health problem. **Bull World Health Organ.** v. 79, n. 8, p. 704-712, 2001.
- WEATHERALL, D. J.; PROVAN, A. B. Red cells I: inherited anaemias. **Lancet.** v. 355, n. 9210, p. 1169-1175, 2000.

WOOD, K. C.; HEBBEL, R. P.; GRANGER, D. N. Endothelial cell P-selectin mediates a proinflammatory and prothrombotic phenotype in cerebral venules of sickle cell transgenic mice. **Am J Physiol Heart Circ Physiol.** v. 286, n. 5, p. H1608-1614, 2004.

WOOD, K. C.; HSU, L. L.; GLADWIN, M. T. Sickle cell disease vasculopathy: a state of nitric oxide resistance. **Free Radic Biol Med.** v. 44, n. 8, p. 1506-1528, 2008.

WRIGHT, E. K. et al. Naip5 affects host susceptibility to the intracellular pathogen *Legionella pneumophila*. **Curr Biol.** v. 13, n. 1, p. 27-36, 2003.

XU, H. et al. Sickle cell disease increases high mobility group box 1: a novel mechanism of inflammation. **Blood.** v. 124, n. 26, p. 3978-3981, 2014.

YANG, K. et al. Toll-like receptor 4 mediates inflammatory cytokine secretion in smooth muscle cells induced by oxidized low-density lipoprotein. **PLoS One.** v. 9, n. 4, p. e95935, 2014.

YERETSSIAN, G. Effector functions of NLRs in the intestine: innate sensing, cell death, and disease. **Immunol Res.** v. 54, n. 1-3, p. 25-36, 2012.

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

ZENNADI, R. et al. Sickle red cells induce adhesion of lymphocytes and monocytes to endothelium. **Blood.** v. 112, n. 8, p. 3474-3483, 2008.

ZHANG, H. et al. Inhibition of myeloperoxidase decreases vascular oxidative stress and increases vasodilatation in sickle cell disease mice. **J Lipid Res.** v. 54, n. 11, p. 3009-3015, 2013.

ZHANG, Q. et al. Circulating mitochondrial DAMPs cause inflammatory responses to injury. **Nature.** v. 464, n. 7285, p. 104-107, 2010.

ZHONG, C. et al. Myeloperoxidase gene-463G > A polymorphism and premature coronary artery disease. **Genet Mol Biol.** v. 32, n. 2, p. 260-263, 2009.

ZHOU, R. et al. A role for mitochondria in NLRP3 inflammasome activation. **Nature.** v. 469, n. 7329, p. 221-225, 2011.

**APÊNDICE A: Artigos produzidos durante o período de doutorado que não fizeram parte da tese**

**Artigos de revisão publicados:**

Wendell Vilas-Boas, Bruno Antônio Veloso Cerqueira, Thassila Nogueira Pitanga, Magda Oliveira Seixas, Joelma Menezes, Cyntia Cajado de Souza, Elisângela Vitória Adorno, Marilda Souza Goncalves. *Sickle cell disease: Only one road, but different pathways for inflammation*. **ABB**, 3:(4A), 2012.

Thassila Nogueira Pitanga, Wendell Vilas-Boas, Bruno Antônio Veloso Cerqueira, Magda Oliveira Seixas, Cynara Gomes Barbosa, Elisangela Vitória Adorno, Marilda Souza Goncalves. *Cytokine profiles in sickle cell anemia: Pathways to be unraveled*. **ABB**, 4(7), 2013.

**Artigos originais submetidos:**

Bruno Antônio Veloso Cerqueira; Wendell Vilas Boas; Jorge Clarêncio; Daniela Andrade; José Pereira de Moura Neto; Angela Zanette; Rayra Pereira Santiago; Caroline Conceição da Guarda; Camylla Vilas Boas Figueiredo; Thassila Nogueira Pitanga; Sanzio Silva Santana; Marilda de Souza Gonçalves. *Surface neutrophils molecules expression in sickle cell anemia: correlation with biomarkers of hemolysis, inflammation and clinical profile*. **J Inflamm**, 2015.

Wendell Vilas Boas; Bruno Antônio Veloso Cerqueira; Angela Zanette; Camylla Vilas Boas Figueiredo; Rayra Pereira Santiago; Caroline Conceição da Guarda; Thassila Nogueira Pitanga; Sanzio Silva Santana; Marilda de Souza Gonçalves. *Association of Homocysteine and inflammatory-related molecules in sickle cell anemia*. **Hematology**, 2015.

## Cytokine profiles in sickle cell anemia: Pathways to be unraveled

Thassila Nogueira Pitanga<sup>1,2</sup>, Wendell Vilas-Boas<sup>1,2</sup>, Bruno Antônio Veloso Cerqueira<sup>1,2,3</sup>,  
 Magda Oliveira Seixas<sup>1,2,4</sup>, Cynara Gomes Barbosa<sup>1,2,4</sup>, Elisângela Vitória Adorno<sup>2,4</sup>,  
 Marilda Souza Gonçalves<sup>1,2,4\*</sup>

<sup>1</sup>Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, Brasil

<sup>2</sup>Instituto de Ciência e Tecnologia do Sangue, Campinas, Brasil

<sup>3</sup>Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilheus, Brasil

<sup>4</sup>Faculdade de Farmácia da Universidade Federal da Bahia, Salvador, Brasil

Email: [mari@focruz.bahia.br](mailto:mari@focruz.bahia.br)

Received 16 May 2013; revised 18 June 2013; accepted 25 June 2013

Copyright © 2013 Thassila Nogueira Pitanga *et al.* This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

### ABSTRACT

Sickle cell anemia (SCA) is a genetically inherited hemolytic disorder characterized by chronic inflammation. Cytokine expression affects the pivotal pathways that contribute to disease pathogenesis, but the mechanisms involved are not well understood. SCA is associated with a proinflammatory state, and an enhanced inflammatory response occurs during vaso-occlusive crisis. The immune system thus plays an important role in this inflammatory condition, with several cell types secreting pro-inflammatory cytokines that contribute to the occurrence of common cyclical events in SCA patients, such as hemolysis, vascular occlusion and inflammation. Studies of these cytokines and chemokines in SCA patients have clarified the mechanisms that underlie this disease and highlighted the need for a better understanding of cytokine participation in SCA pathophysiology.

**Keywords:** Sickle Cell Anemia; Cytokines; Chemokine; Inflammation; Inflammasome

### 1. INTRODUCTION

Sickle cell anemia (SCA) is an inherited disorder characterized by homozygosis for the mutation that causes hemoglobin S (HbS) production. This point mutation (GAG > GTG) occurs in the sixth codon of the beta globin gene (*HBB*) and causes valine to replace glutamic acid in the sixth amino acid of the beta ( $\beta$ ) globin chain of the hemoglobin molecule. SCA patients have a heterogeneous clinical outcome characterized by painful vaso-occlusive

crises, stroke, priapism, pulmonary hypertension, acute chest syndrome (ACS) and chronic organ injuries. As a result of this mutation, deoxygenated hemoglobin molecules undergo a polymerization process that is considered the primary event leading to the pathogenesis of SCA [1].

Sickled red blood cells, as well as leukocytes, platelets and the vascular endothelium, are elements that obstruct vessels and trigger vaso-occlusive crises. The hemolysis that occurs in SCA can be both extravascular and intravascular. Intravascular hemolysis occurs when red blood cells (RBCs) rupture and release free hemoglobin into the plasma. Free hemoglobin has inflammatory and oxidant effects that lead to endothelium dysfunction. Other hemolysis products, including heme, reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrogen species, are also released into the bloodstream, where they cause increased oxidative stress and decreased plasma levels of the vasodilator nitric oxide (NO) [2]. Increased ROS and RNS levels and decreased NO levels contribute to the activation of RBCs, leukocytes, platelets and endothelial cells. This activation leads to increased production of proinflammatory and anti-inflammatory cytokines, which gives SCA the characteristics of a chronic inflammatory disease [1,3] (Figure 1).

Several cytokines, such as interleukin-1 beta (IL-1 $\beta$ ) and tumor necrosis factor-alpha (TNF- $\alpha$ ), are associated with the activation of leukocytes, particularly monocytes and neutrophils, in SCA. Several other cytokines are also involved in the chronic inflammatory state that is present in SCA. The activation of cells and the release of cytokines stimulate the NF- $\kappa$ B transcription factor pathway, which regulates the production of interleukin-4 (IL-4), interleukin-6 (IL-6) and interleukin-8 (IL-8). IL-6 and

\*Corresponding author.



## Sickle cell disease: Only one road, but different pathways for inflammation

Wendell Vilas-Boas<sup>1,2</sup>, Bruno Antônio Veloso Cerqueira<sup>1,2,3</sup>, Thassila Nogueira Pitanga<sup>1,2</sup>,  
 Magda Oliveira Seixas<sup>1,2,4</sup>, Joelma Menezes<sup>1,2,4</sup>, Cytia Cajado de Souza<sup>1,2</sup>,  
 Elisângela Vitória Adorno<sup>2,4</sup>, Marilda Souza Goncalves<sup>1,2,4\*</sup>

<sup>1</sup>Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Salvador, Bahia, Brasil

<sup>2</sup>Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia do Sangue, São Paulo, Brasil

<sup>3</sup>Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC), Ilhéus, Bahia, Brasil

<sup>4</sup>Faculdade de Farmácia da Universidade Federal da Bahia (UFBA), Salvador, Bahia, Brasil

Email: \*[mari@bahia.fiocruz.br](mailto:mari@bahia.fiocruz.br)

Received 1 July 2012; revised 2 August 2012; accepted 16 August 2012

### ABSTRACT

Sickle cell disease (SCD) is a genetic disorder characterized by a chronic inflammatory process, and new biomarkers have been studied as promising molecules for understanding the inflammation in its pathophysiology. The hemolysis and the release of molecules associated to the hemoglobin (Hb) catabolism, such as free Hb, iron, and heme, generate an oxidant environment with production of reactive oxygen and nitrogen species. The immune system plays a very important role in the inflammation, with cells secreting pro-inflammatory cytokines and chemokines. There is also a nitric oxide (NO) resistance state, with an impaired NO bioactivity, leading to a vascular dysfunction; activation of platelet, leukocytes, erythrocytes, and endothelial cells, with expression of adhesion molecules and its ligands, and several receptors, that altogether participate at inflammatory process. During inflammation, there is an increase of dendritic cells (DCs) expressing toll like receptors (TLR), but the role of DCs and TLR in SCD pathogenesis is unclear. Also, there are molecules contributing for enhance the endothelium dysfunction, such as homocysteine that has been associated with vascular complications in the pathology of other diseases and it may contribute to the vascular complications presented by SCD patients. Circulating microparticles (MPs) levels are augmented in several diseases and have been described in SCD, where cells membrane compounds are associated to cell's thrombotic and coagulation state, such as tissue factor and phosphatidylserine (PS), which may contribute to endothelial dysfunction. The knowledge of all these biomarkers may contribute to new therapeutic approach discover, improving SCD patient life quality.

\*Corresponding author.

**Keywords:** Sickle Cell Disease; Inflammation; Oxidative Stress; Cells Activation

### 1. INTRODUCTION

Sickle cell disease (SCD) is a genetic disorder, and the sickle cell anemia (HbSS) is the more severe genotype. The disease is characterized by the presence of the hemoglobin S (HbS), where valine replace glutamic acid ( $\beta^6 \text{Glu} \rightarrow \text{Val}$ ) at the beta globin chain, that has a single point mutation (GAG  $\rightarrow$  GTG) at the sixth codon of the  $\beta$ -globin (*HBB*) gene [1].

Sickle cell disease clinical outcome vary widely from mild to severe and has been associated with multi-organ damage and risk of early mortality [1], with acute and chronic clinical manifestations, including vaso-occlusive episodes (VOE), painful crisis, tissue ischemia/reperfusion injury, hemolysis, impaired blood flow as a result of intravascular sickling in capillary and vessels, inflammation processes and high susceptibility to infection, encephalic vascular accident (EVA), dactylitis, leg ulceration, pulmonary hypertension, acute chest syndrome, and priapism [1,2].

Moreover, the disease pathogenesis comprehends a complex network of mechanisms, involving the vaso-occlusive phenomenon and tissue ischemia, with surface and ligands molecules activation from stressed reticulocytes, sickled erythrocytes, leukocytes, platelets and endothelial cells [1-3]; there is also an increase of oxidative stress, secondary to the hemolysis episodes and heme cytotoxicity, electron donation from the iron atom when yet inside the protoporphyrin IX ring, with the generation via Fenton reaction of reactive oxygen and nitrogen species (ROS; RNS), that has a very strong pro-oxidant capacity. Also, there is an increase of nitric oxide (NO) scavenger molecules, a vasodilator that play important

OPEN ACCESS

Scientific  
Research

## **APÊNDICE B: Termo de consentimento livre e esclarecido para pacientes e controles que participaram do manuscrito 1**

Você está sendo convidado a consentir com a participação do menor \_\_\_\_\_, em pesquisas realizadas no Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz – FIOCRUZ - BA, cujo título está especificado a seguir, uma vez que oficialmente é o seu representante legal.

“MOLÉCULAS ASSOCIADAS À ATIVAÇÃO ENDOTELIAL, INTERAÇÕES CÉLULA-CÉLULA E CÉLULAS ENDOTÉLIO: CONTRIBUIÇÕES NOS EVENTOS VASO-OCCLUSIVOS DA ANEMIA FALCIFORME”.

A doença falciforme é uma doença genética muito comum na população de Salvador, sendo que o indivíduo doente apresenta crise de dor, decorrente da oclusão das veias pelas células vermelhas que possuem o formato de foice, podendo também possuir infecção e outros tipos alterações clínicas, como alteração nos olhos, rins, coração, pulmão e cérebro.

Nessa pesquisa estudaremos a doença falciforme, alteração que muda a forma das células vermelhas que ficam rígidas, facilitando a obstrução de veias e juntamente com as células brancas participam das crises de dor e podem contribuir para a ocorrência de derrame, problemas no coração, nos olhos, nervos e pulmões. O sangue retirado será destinado ao estudo do DNA, RNA das células e de algumas substâncias que ajudam na ligação das células às veias, além do estudo de fatores que contribuem para os fenômenos de vaso-occlusão. Os resultados obtidos nesta pesquisa poderão posteriormente servir para estudos futuros de medicamentos novos para a doença.

A sua participação é totalmente voluntária e a sua permissão para participar do estudo pode ser retirada a qualquer momento, não resultando em punições.

O objetivo deste trabalho é investigar aspectos epidemiológicos, clínicos e laboratoriais da população atendida na fundação HEMOBA.

Os registros da participação do menor no estudo serão mantidos confidencialmente, sendo do conhecimento apenas da equipe participante do projeto e do médico que o acompanha. As amostras coletadas serão identificadas por código, bem como os dados individuais dos exames e testes, que serão do conhecimento somente dos pesquisadores envolvidos na pesquisa. Desta forma, a sua identidade será mantida em segredo e nenhum outro grupo terá acesso às informações coletadas, tais como seguradoras, empregadores ou superiores, de acordo com a resolução CNS 340/2004, item V.1.e.

A permissão para que o menor participe deste estudo não implicará na retirada de sangue adicional, de modo que será utilizada uma quantidade remanescente da mesma amostra coletada para a



realização dos exames solicitados pelo médico. Também queremos que você concorde que as amostras colhidas sejam armazenadas e possam ser utilizadas em estudos futuros, desde que estes estudos adicionais sejam analisados por um Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos e sigam os aspectos éticos determinados nas resoluções 466/2012 e 347/05 do Conselho Nacional de Saúde.

Comunicamos que o sangue será colhido do braço e poderá acarretar em riscos e desconfortos, como sangramento e dor. Entretanto, a coleta de sangue será realizada por pessoal habilitado e especializado, visando diminuir esses riscos. A realização de coletas adicionais dependerá do médico e estará relacionada, simplesmente, ao acompanhamento clínico e avaliação periódica do menor.

A participação do menor no estudo não trará benefícios, mas possibilitará a obtenção de dados que poderão ser utilizados futuramente no acompanhamento de indivíduos que apresentam alguma doença conhecida e na implantação de políticas de saúde.

Assinatura do responsável \_\_\_\_\_

Data \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_



Nome do responsável (letra de forma) \_\_\_\_\_

RG: \_\_\_\_\_

Endereço \_\_\_\_\_

Nome Testemunha 1 \_\_\_\_\_

RG: \_\_\_\_\_

Nome Testemunha 2 \_\_\_\_\_

RG: \_\_\_\_\_

Por favor, entre em contato com uma das pessoas abaixo caso você necessite de maiores esclarecimentos:

Dra. Marilda de Souza Gonçalves - Coordenadora do projeto - Laboratório de Pesquisa em Anemias da Faculdade de Farmácia/UFBA e Laboratório de Hematologia, Genética e Biologia Computacional (LHGB)/Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz (CPqGM) – Fiocruz-Bahia. Fone (71) 3176-2226.

Magda Oliveira Seixas – Responsável pelo desenvolvimento do projeto – LHGB/CPqGM.  
Fone (71) 3176-2226.

## **APÊNDICE C: Termo de consentimento livre e esclarecido para pacientes e controles que participaram dos manuscritos 2 e 3**

Você está sendo convidado a consentir a participação do menor \_\_\_\_\_ na pesquisa vinculada ao projeto intitulado “Micropartículas circulantes na anemia falciforme: disfunção de células endoteliais vasculares e fenômenos trombóticos” que será realizada no Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz – FIOCRUZ – BA.

Esta pesquisa é importante, uma vez que poderá fornecer informações sobre a anemia falciforme, principalmente a respeito de fatores que possam influenciar nos fenômenos relacionados à oclusão de vasos sanguíneos que são frequentes nesta doença. Cumpre ressaltar que a descoberta de mecanismos envolvidos no fenômeno de obstrução das veias e artérias pode contribuir para a melhoria do acompanhamento médico do paciente, podendo fornecer dados que podem servir como base para a descoberta de tratamentos novos.

A participação é totalmente voluntária e pode ser retirada a qualquer momento, não resultando em punições.

Os registros da participação do menor no estudo serão mantidos confidencialmente, sendo do conhecimento apenas da equipe participante do projeto e do médico que o acompanha. As amostras coletadas serão identificadas por código, bem como os dados individuais dos exames e testes, que serão do conhecimento somente dos pesquisadores envolvidos na pesquisa. Desta forma, a sua identidade será mantida em segredo e nenhum outro grupo terá acesso às informações coletadas, tais como seguradoras, empregadores ou superiores, de acordo com a resolução CNS 340/2004, item V.1.e.

A permissão para que o menor participe do estudo implicará na permissão para o acesso ao seu prontuário e para a retirada de 15 mL de sangue para que possamos fazer as análises bioquímicas, hematológicas e moleculares e obter algumas células circulantes. Também queremos que você concorde que as amostras colhidas sejam armazenadas e possam ser utilizadas em estudos futuros, desde que estes estudos adicionais sejam analisados por um Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos e sigam os aspectos éticos determinados nas resoluções 196/96, 347/05 e 441/11 do Conselho Nacional de Saúde.

Comunicamos que o sangue será colhido do braço, o que poderá acarretar em riscos pequenos e desconfortos mínimos, com possibilidade de sangramento e dor. Entretanto, a coleta de sangue será realizada por pessoal habilitado e especializado, visando diminuir eventuais riscos. A realização de coletas adicionais dependerá do seu médico e estará relacionada, simplesmente, ao acompanhamento clínico e avaliações médicas periódicas. A participação no estudo não trará

benefícios imediatos aos pacientes, mas possibilitará a obtenção de dados que poderão ser utilizados futuramente no acompanhamento de indivíduos com anemia falciforme, podendo servir como base para a descoberta de tratamentos novos, bem como para a implantação de políticas de saúde.

ASSINATURA DO RESPONSÁVEL:	Digital
NOME:	
ENDEREÇO:	

**Aceito participar do estudo**

DATA: \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
Nome Testemunha 1

RG: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
Nome Testemunha 1

RG: \_\_\_\_\_

Por favor, entre em contato com uma das pessoas abaixo caso você necessite de maiores esclarecimentos:

Dra. Marilda de Souza Gonçalves - Coordenadora do projeto - Laboratório de Pesquisa em Anemias da Faculdade de Farmácia/UFBA e Laboratório de Hematologia, Genética e Biologia Computacional (LHGB) do CPqGM – FIOCRUZ - Fone (71) 3176-2256

Thassila Nogueira Pitanga - Laboratório de Hematologia, Genética e Biologia Computacional (LHGB) do CPqGM/FIOCRUZ - Fone (71) 3176-2256

Comitê de Ética e Pesquisa (CEP) - CPqGM/FIOCRUZ – Fone: 3176-2285

## APÊNDICE D: Questionário epidemiológico para pacientes e controles

Nome: (NOME) \_\_\_\_\_ Sigla: (sig) \_\_\_\_\_ Telefone: ( ) \_\_\_\_\_

Endereço: \_\_\_\_\_

Registro: (REG) \_\_\_\_\_ Nº Pront. HEMOBA: (PRON) \_\_\_\_\_ Data de Nasc.: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Idade: (I) \_\_\_\_\_ Gênero: (GENER) ( ) Masculino [0] ( ) Feminino [1]

01. Idade do 1º diagnóstico de Doença Falciforme: (ID) ( ) <6 m [0] ( ) 6m - 4anos [1] ( ) 5 - 9anos [2] ( ) 10 - 14anos [3] ( ) 15 - 17anos [4] ( ) > 17 anos [5]

02. Eletroforese de Hb (EHB) ( ) AA[0] ( ) SS[1] ( ) SC[2] ( ) SB+[3] ( ) SB<sub>c</sub>[4] ( ) SD[5]

03. Haplótipo (HAPL) ( ) Sen[0] ( ) Car[1] ( ) Ben[2] ( ) Cam[3] ( ) Sau-Ara [4] ( ) Atip[5] ( ) I[6] ( ) II[7] ( ) III[8]

04. Talassemia (TAL) ( ) Negativo[0] ( ) Hetero 3.7[1] ( ) Homo 3.7[2] ( ) Hetero 4.2[3] ( ) Homo 4.2[4]

Mieloperoxidase (MPO) ( ) GG[0] ( ) AG[1] ( ) AA[2]

Alelo mutante Mieloperoxidase ? (MUTMPO) ( ) NÃO [0] ( ) SIM [1]

Alfa 1 antitripsina (A1ATP) ( ) MM[0] ( ) MZ[1] ( ) MS[2] ( ) SZ[3] ( ) SS[4] ( ) ZZ[5]

05. Já esteve internado? (INTER) ( ) NÃO [0] ( ) SIM [1]

Se SIM, quantas vezes? (QINTER) ( ) 1 [0] ( ) 2-5 [1] ( ) 6-10 [2] ( ) 11 ou + [3]

Qual especialidade? (ESPEC) ( ) Cardiologia [0] ( ) Oftalmologia [1] ( ) Neurologia [2] ( ) Infectologia [3] ( ) Pneumologia [4] ( ) Cirurgia [5] ( ) Angiologia [6] ( ) Nefrologia [7] ( ) Clínica da Dor [8] ( ) Outras [9]

06. Já teve pneumonia? (PNEU) ( ) NÃO [0] ( ) SIM [1]

Se SIM, quantas vezes? (QPNEU) ( ) 1[0] ( ) 2-3[1] ( ) 4-6[2] ( ) 7 ou + [3]

Se SIM, teve febre? (FEBRE) ( ) NÃO [0] ( ) SIM [1]

Anormalidade no RX? (ARX) ( ) NÃO [0] ( ) SIM [1]

Quando internado, usou medicação? (MPNEU) ( ) NÃO [0] ( ) SIM [1]

Quais? (DESCMPNEU) \_\_\_\_\_

07. Teve ou tem esplenomegalia? (ESPLE) ( ) NÃO [0] ( ) SIM [1]

Em que período? (PERIOESPLE) ( ) <6m[0] ( ) 6m-1ano [1] ( ) 2-3a [2] ( ) 4-5a [3] ( ) >6a [4]

Teve crise de seqüestro esplênico? (SEQESPLE) ( ) NÃO [0] ( ) SIM [1]

08. Faz uso profilático de Penicilina? (PROP) ( ) NÃO[0] ( ) SIM [1]

Se SIM, qual? (QPEN) ( ) Penicilina V oral [0] ( ) Penicilina benzatina [1]

Se Sim, há quanto tempo? (QTPEN) ( ) até 1 ano [0] ( ) + de 1 ano a 3 anos [1] ( ) + 3 anos a 5 anos [2] ( ) + 5 anos a 7 anos [3] ( ) + de 7 anos [4]

09. Já teve AVC? {AVC} ( ) NÃO [0] ( ) SIM [1]  
 Se SIM, quantas vezes? {QAVC} \_\_\_\_\_  
 Se SIM, seqüelas do AVC? {SEQAVC} ( ) NÃO [0] ( ) SIM [1]  
 Já fez ressonância magnética? {RESSOMAG} ( ) NÃO [0] ( ) SIM [1]  
 Alguma alteração? {ALTRESSOMAG} ( ) NÃO [0] ( ) SIM [1]  
 Já fez Doppler Transcraniano? {dtc} ( ) NÃO [0] ( ) SIM [1]  
 Se, SIM, qual resultado? {dtcres} ( ) Normal [0] ( ) Alterado [1]
10. Espectomizado? {ESPECTO} ( ) NÃO [0] ( ) SIM [1]  
 Esplenectomia: {TIPOESPECTO} ( ) Total [0] ( ) Parcial [1]
11. Apresenta asma? {ASMA} ( ) NÃO [0] ( ) SIM [1]  
 Se SIM, quantas crises nos últimos 06 meses? {QASMA} ( ) 0[0] ( ) 1-3[1] ( ) 4-7[2] ( ) 8ou+[3]  
 Faz uso regular de nebulização?{NEBU} ( ) NÃO [0] ( ) SIM [1]
12. Tem crises de dor? {CRISDOR} ( ) NÃO [0] ( ) SIM [1]  
 Se SIM, quantas crises nos últimos 06 meses? {QCRISDOR} ( ) 0[0] ( ) 1-3[1] ( ) 4-7[2] ( ) 8ou+[3]  
 Quando foi a última crise? {ULTCRISDOR} ( ) <1mês [0] ( ) 1-3m [1] ( ) 4m ou+[2]  
 Usa medicação para a dor? {MDOR} ( ) NÃO [0] ( ) SIM [1]  
 Prescrita por um médico? {PRESMDOR} ( ) NÃO [0] ( ) SIM [1]  
 Assistido por especialista em dor? {ESPECMDOR} ( ) NÃO [0] ( ) SIM [1]  
 Faz tratamento com hidroxiuréia? {HYDREIA} ( ) NÃO [0] ( ) SIM [1]
13. Faz uso regular de medicamentos? {MEDIC} ( ) NÃO [0] ( ) SIM [1]  
 Se SIM, qual? {DESCMEDIC} \_\_\_\_\_  
 Com que frequência? {FREQMEDIC} ( ) Diário [0] ( ) Dias alternados[1] ( ) Semanal[2]  
 ( ) Quinzenal[3] ( ) Mensal [4] ( ) Bimestral[5] ( ) Semestral [6]
14. Vaso-Ocusão: {VO} ( ) NÃO [0] ( ) SIM [1] Quantas vezes? {QVO} \_\_\_\_\_  
 Fez uso de alguma medicação? {MVO} ( ) NÃO [0] ( ) SIM [1]
15. Retinopatia: {RETIN} ( ) NÃO [0] ( ) SIM [1]  
 Faz consultas periódicas com oftalmologista? {CONSOFTAL} ( ) NÃO [0] ( ) SIM [1]
16. Infecções: {INFEC} ( ) NÃO [0] ( ) SIM [1]  
 Quais? {DESCINFEC} ( ) Rinite [0] ( ) Sinusite [1] ( ) Otite [2]  
 ( ) Faringite [3] ( ) Amigdalite [4] ( ) Vias aéreas sup. [5]  
 ( ) ITU [6] ( ) Bronquite [7] ( ) ITR [8]  
 ( ) Outros [9]  
 Fez uso de alguma medicação? {MINFEC} ( ) NÃO [0] ( ) SIM [1]
17. Priapismo: {PRIAP} ( ) NÃO [0] ( ) SIM [1] ( ) NÃO SE APLICA [9]  
 N° de vezes: {QPRIAP} ( ) Até 4 [0] ( ) 05-09 [1] ( ) 10 ou +[2]  
 Fez uso de alguma medicação? {MPRIAP} ( ) NÃO [0] ( ) SIM [1]
18. Úlcera maleolar: {ULCMALEO} ( ) NÃO [0] ( ) SIM [1] Quantas vezes? {QULCMALEO} \_\_\_\_\_  
 Idade da primeira úlcera: {IDULC} ( ) Até 4 anos [0] ( ) 5 - 9 [1] ( ) 10 - 17 [2]  
 ( ) > 17 [3]
19. Síndrome torácica aguda: {SDTOR} ( ) NÃO [0] ( ) SIM [1]  
 Quantas vezes? {QSDTOR} ( ) Até 2 [0] ( ) 03-05 [1] ( ) 06 ou + [2]
20. Alterações ósseas: {ALTOSSEA} ( ) NÃO [0] ( ) SIM [1]  
 Quais? {DESCALTOSSEA} \_\_\_\_\_

21. Insuficiência Renal Aguda: {INSRENAG} ( ) NÃO [0] ( ) SIM [1]  
 Quantas vezes? {QINSRENAG} ( ) Até 2 [0] ( ) 03-05 [1] ( ) 06 ou + [2]
22. Insuficiência Renal Crônica: {INSRENCRO} ( ) NÃO [0] ( ) SIM [1]  
 Idade diagnóstico: {IDINSRENCRO} ( ) Até 5 anos [0] ( ) 06-11 [1] ( ) 12 ou + [2]
23. Alterações cardíacas: {INSCARD} ( ) NÃO [0] ( ) SIM [1]  
 Qual alteração? {QUALALTCA} \_\_\_\_\_  
 Idade diagnóstico: {IDINSCARD} ( ) Até 5 anos [0] ( ) 06-11 [1] ( ) 12 ou + [2]  
 Fez eletrocardiograma? {ELETRO} ( ) NÃO [0] ( ) SIM [1]  
 Fez ecocardiograma? {ECOCARD} ( ) NÃO [0] ( ) SIM [1]
24. Seqüestro hepático: {SEQHEP} ( ) NÃO [0] ( ) SIM [1] Quantas vezes? {QSEQHEP} \_\_\_\_\_
25. Insuficiência respiratória: {INSRESP} ( ) NÃO [0] ( ) SIM [1] Quantas vezes? {QINSRESP} \_\_\_\_\_
26. Distúrbio do sono? {DISTSONO} ( ) NÃO [0] ( ) SIM [1]
27. Litíase biliar: {LITIBILI} ( ) NÃO [0] ( ) SIM [1] Quantas vezes? {QLITIBILI} \_\_\_\_\_
28. Cirurgia: {CIRURG} ( ) NÃO [0] ( ) SIM [1]  
 Quais? {QUALCIRURG} \_\_\_\_\_
29. Se SIM, fez uso de profilaxia antibiótica? {PROFANTIB} ( ) NÃO [0] ( ) SIM [1]
30. Completou o calendário vacinal? {CALVAC} ( ) NÃO [0] ( ) SIM [1]  
 Fez uso das seguintes vacinas? {USOVAC} ( ) 7 valente [0] ( ) 23 valente [1]  
 ( ) Meningo [2] ( ) Haemophilus [3]
31. Fez uso de hemoderivados? {HEMODER} ( ) NÃO [0] ( ) SIM [1]  
 Se SIM, quantas vezes? {QHEMODER} \_\_\_\_\_
32. Possui outra patologia? {PATOLOG} ( ) NÃO [0] ( ) SIM [1]  
 Quais? {DESCPATOLOG} ( ) Hipertensão [0] ( ) Diabetes [1] ( ) Obesidade [2]  
 ( ) Febre Reumática [3] ( ) Hipertensão pulmonar [4] ( ) D. de Chagas [5]  
 ( ) Osteoporose [6] ( ) Trombose Venosa Profunda [7] ( ) Nefrolitíase [8]  
 ( ) Outros [9]