



VANESSA TONIN GARRIDO

**AVALIAÇÃO DO PAPEL DAS CITOCINAS
INFLAMATÓRIAS, LIGHT E CD40L, NA INFLAMAÇÃO
MEDIADA POR PLAQUETAS NA ANEMIA FALCIFORME**

CAMPINAS

2014



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS

VANESSA TONIN GARRIDO

**AVALIAÇÃO DO PAPEL DAS CITOCINAS INFLAMATÓRIAS, LIGHT E
CD40L, NA INFLAMAÇÃO MEDIADA POR PLAQUETAS NA ANEMIA
FALCIFORME**

Orientadora: Nicola Amanda Conran Zorzetto

Coorientador: Fernando Ferreira Costa

*Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Fisiopatologia Médica da Faculdade de Ciências Médicas para
obtenção do título de Doutora em Ciências.*

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA
TESE DEFENDIDA PELA ALUNA **VANESSA TONIN
GARRIDO** E ORIENTADA PELA **DRA. NICOLA
AMANDA CONRAN ZORZETTO**.

Assinatura da Orientadora

CAMPINAS
2014

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas
Maristella Soares dos Santos - CRB 8/8402

G193a Garrido, Vanessa Tonin, 1985-
Avaliação do papel das citocinas inflamatórias,
LIGHT e CD40L, na inflamação mediada por plaquetas
na anemia falciforme / Vanessa Tonin Garrido. --
Campinas, SP : [s.n.], 2014.

Orientador : Nicola Amanda Conran Zorzetto.
Coorientador : Fernando Ferreira Costa.
Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de
Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Anemia falciforme. 2. Plaquetas. 3. Inflamação. I.
Conran, Nicola. II. Costa, Fernando Ferreira, 1950-. III.
Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de
Ciências Médicas. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Role of the pro-inflammatory cytokines, LIGHT and CD40L, in platelet-mediated inflammation in sickle cell anemia

Palavras-chave em inglês:

Sickle cell anemia

Platelets

Inflammation

Área de concentração: Fisiopatologia Médica

Titulação: Doutora em Ciências

Banca examinadora:

Nicola Amanda Conran Zorzetto [Orientador]

Licio Augusto Velloso

Erich Vinicius de Paula

Claudia Regina Bonini Domingos

Antonio Fabron Junior

Data de defesa: 27-02-2014

Programa de Pós-Graduação: Fisiopatologia Médica

BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE DOUTORADO

VANESSA TONIN GARRIDO

Orientador (a) PROF(A). DR(A). NICOLA AMANDA CONRAN ZORZETTO

MEMBROS:

1. PROF(A). DR(A). NICOLA AMANDA CONRAN ZORZETTO

2. PROF(A). DR(A). LICIO AUGUSTO VELLOSO

3. PROF(A). DR(A). ERICH VINICIUS DE PAULA

4. PROF(A).DR(A). CLAUDIA REGINA BONINI DOMINGOS

5. PROF(A).DR(A). ANTONIO FABRON JUNIOR

Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia Médica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas

Data: 27 de fevereiro de 2014

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de agradecer à minha mentora, **Dra. Nicola Conran**, pelo constante apoio e acompanhamento científico. Sua experiência e dedicação foram fundamentais para o meu crescimento profissional. Agradeço também à meu coorientador, **Dr. Fernando Ferreira Costa**, pela oportunidade e à toda equipe de médicos e enfermeiros responsáveis pelo atendimento e acompanhamento dos pacientes com anemia falciforme. Agradeço, em especial, a todos os pacientes e voluntários do Hemocentro da UNICAMP, Fundação HEMOPE e King's College Hospital que participaram deste estudo. Espero, algum dia, conseguir retribuir esta cooperação.

Gostaria de agradecer a todos que me auxiliaram de forma direta ou indireta na execução desta tese. Aos funcionários, **Ana Leda, Irene, Janine, Ana Flávia, Lena, Simone, Ucha, Daniela, Adriana, Carolina, Andrey, Dul, Patrícia, Ana Luísa** e aos colegas do laboratório, **Fernanda, Regiane, Carol “cover”, Emilia, Telma, Lician, Flávia Pallis, Camila, Taís, Flávia Lopes, Kleber, Marcos André**.

Agradeço especialmente as minhas amigas queridas pelas risadas, desabafos, risotos e também pela ajuda na bancada, seja no período da manhã ou no turno da noite. Obrigada **Renata**, minha companheira de bancada, reagentes e plaquetas, **Tati**, companheira de ELISA e nas horas vagas também babá, **Daiana**, minha professora do “Cellix”, **Angélica**, amiga dos “projetos paralelos”, **Flávia Boca**, minha “roommate”, obrigada pelo abrigo. E por último, mas não menos importante, **Venina Marcela**, minha parceira FUNDAP, obrigada pela amizade sincera durante esses sete anos.

Não posso deixar de agradecer aos amigos que conheci em Londres. Obrigada **Waldinei, Nasser e Eudoxia** por me acolherem e cuidarem tão de bem mim. Aos amigos do James Black Centre, **Laura, Siana, Maria, Neeti, Suleyman, Tim, Nick, Florence, Anna, Amandine, Claire, Annabelle, Stephen**, obrigada pelas “happy hours” no The Sun e por me aturarem tantas vezes reclamando da comida e do frio. Agradeço também à minha orientadora em Londres, **Prof. Swee Lay Thein**, pela oportunidade única de fazer parte da equipe de pesquisadores do King's College London.

Em especial gostaria de agradecer imensamente pela paciência e amor de meu filho **Luís Fernando**, meu companheiro **Heberth** e minha família. Obrigada por estarem presentes em todas as etapas de minha vida, mesmo quando eu estou fisicamente tão longe.

Agradeço à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro para a realização deste trabalho e do estágio de pesquisa no exterior (BEPE).

"The important thing is not to stop questioning; curiosity has its own reason for existing."

Albert Einstein (1879 - 1955)

RESUMO

A anemia falciforme (AF) é uma hemoglobinopatia hereditária resultante de uma mutação no gene que codifica a subunidade β -globina, levando à produção da hemoglobina S (HbS) nos eritrócitos. Com a polimerização da HbS, durante a desoxigenação, ocorre a deformação e fragilização das células vermelhas, resultando em anemia hemolítica e eventos vaso-oclusivos. As crises vaso-oclusivas são a principal causa de morbidade nos pacientes com anemia falciforme e as plaquetas parecem ter um papel importante nesse processo, pois uma vez ativadas elas secretam e expressam mediadores que induzem uma resposta inflamatória tanto em leucócitos como em células endoteliais. A proposta deste trabalho foi investigar a produção e expressão dos mediadores inflamatórios derivados de plaquetas, LIGHT e CD40L, em controles (indivíduos saudáveis; CON), pacientes com anemia falciforme (AF) e pacientes com anemia falciforme em terapia com hidroxiureia (AFHU). Também avaliamos o envolvimento das plaquetas e seus mediadores na ativação de leucócitos e células endoteliais. Os níveis plasmáticos de ambas citocinas foram significativamente maiores em indivíduos AF e AFHU do que nos indivíduos controle e, curiosamente, apesar da hidroxiureia ser capaz de diminuir a concentração plasmática de algumas citocinas inflamatórias, a terapia com essa droga não foi associada com qualquer alteração nos níveis de LIGHT ou CD40L. Foi observada uma correlação expressiva da concentração de LIGHT com níveis plasmáticos de CD40L, IL-8, ICAM-1, Trombospondina-1 e TNF- α , enquanto que a concentração plasmática de CD40L correlacionou-se com os níveis de TNF- α e principalmente com Trombospondina-1, indicando que tanto LIGHT como CD40L podem estar participando ou então refletindo a inflamação crônica presente na anemia falciforme. A expressão proteica de LIGHT foi significativamente maior na superfície de plaquetas de indivíduos AF e AFHU em comparação com plaquetas CON e apresentou uma correlação com marcadores de ativação plaquetária. A secreção de LIGHT pelas plaquetas foi determinada por ELISA e concentrações significativas dessa citocina puderam ser detectadas no sobrenadante de plaquetas CON e AF, sugerindo que essas células podem ser uma fonte importante de LIGHT na circulação. Apesar da expressão de CD40L não ter sido detectada na superfície das plaquetas de pacientes e controles, as plaquetas de pacientes AF secretaram uma

quantidade maior de CD40L em comparação aos controles e foi observada uma correlação significativa entre a liberação de LIGHT e CD40L em plaquetas de pacientes AF, indicando que pode existir uma associação na secreção dessas duas citocinas. A expressão dos receptores de LIGHT (HVEM e LT β R) e de CD40L (CD40) foi avaliada por citometria de fluxo em plaquetas, neutrófilos, linfócitos e monócitos. Foi observado que o receptor HVEM estava mais expresso em plaquetas e linfócitos de pacientes com anemia falciforme, enquanto que a expressão do receptor CD40 estava elevada nas plaquetas, nos neutrófilos, nos linfócitos e nos monócitos de pacientes, comparando com o grupo controle. Esses dados mostram que a via de sinalização de LIGHT e CD40L pode estar alterada na anemia falciforme, contribuindo com a ativação dos leucócitos. Quando avaliamos a participação das plaquetas na ativação dos leucócitos, observamos que as plaquetas de indivíduos com anemia falciforme foram eficientes em aumentar a expressão do marcador de ativação, CD69, nos linfócitos e também em induzir o fenótipo pró-inflamatório nos monócitos. Enquanto que a co-cultura de HUVECs com plaquetas demonstrou que as plaquetas de pacientes com anemia falciforme possuem uma capacidade maior de induzir a expressão de ICAM-1 em células endoteliais do que as plaquetas de indivíduos controle. Na presença de anticorpos anti-CD40L observamos uma redução drástica no aumento da expressão de ICAM-1 pelas plaquetas e apesar dessa expressão também ter sido reduzida na presença de anticorpos anti-LIGHT, esses resultados não foram estatisticamente significativos. Interessantemente, altas concentrações plasmáticas de LIGHT estavam associadas com a elevada velocidade de regurgitação tricúspide, um indicativo de hipertensão pulmonar na anemia falciforme e uma associação significativa também foi encontrada entre níveis elevados de CD40L e pacientes com histórico de Síndrome Torácica Aguda. Essas evidências sugerem que LIGHT e CD40L parecem estar contribuindo com a ativação dos leucócitos e do endotélio, exercendo um papel importante na fisiopatogenia da anemia falciforme e aparentemente nas manifestações clínicas desta doença. Os resultados encontrados neste estudo evidenciam a importância que as plaquetas e seus mediadores inflamatórios, LIGHT e CD40L, podem ter na propagação da inflamação vascular presente na anemia falciforme, se tornando possíveis alvos para novas abordagens terapêuticas.

ABSTRACT

Sickle cell disease results from a single amino acid substitution in the gene encoding the β -globin subunit, leading to hemoglobin S production in red blood cells. Polymerization of deoxygenated sickle hemoglobin leads to decreased deformability of red blood cells, resulting in hemolytic anemia and vaso-occlusive events. Platelets appear to play an important role in the vaso-occlusive process, as following their activation they express and secrete mediators that induce an inflammatory response in endothelial cells and leukocytes. The purpose of this study was to investigate the production and expression of LIGHT and CD40L on platelets, the presence of this protein in the plasma of controls (healthy subjects; CON), sickle cell anemia patients (AF) and sickle cell anemia patients on hydroxyurea therapy (AFHU). In addition, this study evaluated the involvement of platelets and their mediators, LIGHT and CD40L, in the activation of leukocytes and endothelial cells. Plasma levels of both cytokines were significantly higher in AF and AFHU individuals than in control individuals and interestingly, HU therapy was not associated with a reduction in these levels. A significant correlation was observed between levels of LIGHT with plasma levels of CD40L, IL-8, ICAM-1, Thrombospondin -1 and TNF- α , whereas the plasma concentration of CD40L correlated with levels of TNF- α and especially with plasma Thrombospondin-1. LIGHT expression was significantly higher on the surface of platelets from AF and AFHU subjects, compared with CON individuals and this expression demonstrated a correlation with markers of platelet activation. LIGHT secretion was determined by ELISA and significant concentrations of this cytokine could be detected in the supernatant of platelets from CON and AF individuals, indicating that platelets may be an important source of LIGHT. Although CD40L expression was not detected on the platelet surface in patients or controls, sickle platelets secreted an increased amount of CD40L, compared to controls. A significant correlation was observed between CD40L and LIGHT release in sickle cell patients, indicating that the production of these two proteins may be tightly coupled. The expression of LIGHT (HVEM and LT β R) and CD40L (CD40) receptors was evaluated by flow cytometry on the surface of platelets, neutrophils, lymphocytes and monocytes. An increased HVEM receptor expression was observed on the platelets and lymphocytes of sickle cell patients, whereas the expression of the CD40

receptor was elevated on platelets, neutrophils, lymphocytes and monocytes from sickle cell patients, compared to control subjects. Evaluating the contribution of platelets to leukocyte activation, we observed that platelets from sickle cell anemia individuals increased the expression of the activation marker, CD69, on lymphocytes and also induced a pro-inflammatory phenotype on monocytes. Co-culture of HUVEC with platelets demonstrated that sickle cell platelets have an increased ability to induce ICAM-1 expression on endothelial cells than platelets from control subjects. Furthermore, in the presence of anti-CD40L antibodies, a drastic reduction was observed in this increase. Although the expression of endothelial ICAM -1 was also reduced in the presence of anti-LIGHT antibodies, these results were not statistically significant. Interestingly, high plasma concentrations of LIGHT were associated with elevated tricuspid regurgitant velocity, indicative of pulmonary hypertension in sickle cell anemia. A significant association was also found between high levels of CD40L and patients with a lifetime history of acute chest syndrome. LIGHT and CD40L appear to contribute to leukocyte and endothelial activation, playing an important role in the pathophysiology of sickle cell anemia and apparently in the clinical manifestations of this disease. These results highlight the important role that platelets and their inflammatory mediators may play in the vascular inflammation that is known to occur in sickle cell anemia.

LISTA DE ABREVIATURAS

ACD - Ácido Cítrico Dextrose

AF - Pacientes com anemia falciforme

AFHU - Pacientes com anemia falciforme em terapia com hidroxiureia

ANOVA – Análise de variância

APC - *Allophycocyanin*

AVC - Acidente Vascular Cerebral

BAC - Beta Actina

CD106 - Molécula de Adesão Vascular-1 (VCAM-1)

CD11a - Subunidade α da integrina LFA-1

CD11b - Subunidade α da integrina Mac-1

CD14 – Cluster de diferenciação 14

CD142 - Fator Tecidual

CD16 - Molécula de Adesão Vascular-1 (VCAM-1)

CD16 - Receptor Fc γ RIIIa

CD3 - Cluster de diferenciação 3

CD36 - Cluster de diferenciação 36

CD40L - Ligante para o CD40

CD47 - Cluster de diferenciação 47

CD54 - Molécula de Adesão Intercelular-1 (ICAM-1)

CD62E - E-selectina

CD62P - P-selectina

CD66b - Molécula de adesão celular relacionada ao antígeno carcinoembrionário 8 (CEACAM-8)

CD69 - Marcador de ativação de linfócitos

cDNA - Ácido Desoxirribonucleico complementar

CON - Controles (indivíduos saudáveis)

DFSC - Pacientes com doença falciforme SC

DNA - Ácido desoxirribonucleico

DNase I - Desoxirribonuclease

EDTA - Ácido Etilenodiaminotetracético

ELISA - *Enzyme Linked Immunosorbent Assay* (imuno ensaio enzimático)

F - *Primer forward*

FBS - *Fetal Bovine Serum* (soro bovino fetal)

FITC - *Fluorescein Isothiocyanate*

FSC - *Forward scatter*

FT - Fator tecidual

GAPDH - Gliceraldeído-3-Fosfato Desidrogenase

GP IIb/IIIa - Integrina alfa IIb beta 3 (receptor para fibrinogênio)

HbF - Hemoglobina Fetal

HbS - Hemoglobina S

HU - Hidroxiureia

HUVEC - Células Endoteliais de Veia Umbilical Humana

ICAM-1- Molécula de Adesão Intercelular-1

IL-13 - Interleucina 13

IL-1 β - Interleucina 1 beta

IL-6 – Interleucina 6

IL-8 - Interleucina 8

K - Potássio

LDH – Lactato desidrogenase

LFA-1 - Antígeno-1 associado à função linfocitária

Mac-1 - Antígeno de macrófago 1

MCP-1 Proteína Quimiotática de Monócito 1

MIF – Média de intensidade de fluorescência

mRNA – Ácido ribonucleico mensageiro

N/D – Não determinado

Na - Sódio

PBS - *Phosphate Buffered Saline* (solução salina tamponada com fosfato)

PCR - Reação em Cadeia da Polimerase

P-CR - Proteína C-reativa

PE - *Phycoerythrin*

PLQs - Plaquetas

PRP - Plasma Rico em Plaquetas

R - *Primer reverse*

RNA - Ácido Ribonucleico

SSC - *Side Scatter*

TA - Temperatura Ambiente

TGF- β - Fator de transformação do crescimento beta

TNF- α - Fator de Necrose Tumoral alfa

UA - Unidades arbitrárias

VCAM-1 - Molécula de Adesão Vascular-1

VRT – Velocidade regurgitante tricúspide

α IIB β 3 - Integrina alfa IIB beta 3 (GPIIb/IIIa, receptor para fibrinogênio)

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Sequência dos <i>primers</i> utilizados neste estudo.	58
Tabela 2. Dados demográficos e hematológicos dos pacientes com doença falciforme.	64
Tabela 3. Correlação dos níveis plasmáticos de sLIGHT com parâmetros hematológicos e laboratorial.	66
Tabela 4. Correlação dos níveis plasmáticos de sCD40L com parâmetros hematológicos e laboratorial.	67
Tabela 5. Associação de sLIGHT com manifestações clínicas na anemia falciforme.	69
Tabela 6. Correlação dos níveis plasmático de sLIGHT com outras citocinas inflamatórias e marcadores de vasculopatia nos grupos de pacientes e controles.	70
Tabela 7. Correlação dos níveis plasmático de sCD40L com outras citocinas inflamatórias e marcadores de vasculopatia nos grupos de pacientes e controles.	70
Tabela 8. Dados demográficos e hematológicos dos sujeitos controle e dos pacientes com anemia falciforme no cohort de Londres.	99
Tabela 9. Associação de sCD40L com manifestações clínicas na anemia falciforme.	102
Tabela 10. Correlação dos níveis plasmático de sLIGHT com outras citocinas inflamatórias e Trombospondina-1.	104
Tabela 11. Correlação dos níveis plasmático de sCD40L com outras citocinas inflamatórias e Trombospondina-1.	105
Tabela 12. Correlação dos níveis plasmáticos de sLIGHT com parâmetros hematológicos.	107
Tabela 13. Correlação dos níveis plasmáticos de sLIGHT com parâmetros laboratoriais.	108
Tabela 14. Correlação dos níveis plasmáticos de sCD40L com parâmetros hematológicos.	110
Tabela 15. Correlação dos níveis plasmáticos de sCD40L com parâmetros laboratoriais.	111

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** A concentração plasmática de sLIGHT (A) e sCD40L (B) foi determinada por ELISA de alta sensibilidade em indivíduos controle (CON), pacientes com anemia falciforme (AF), pacientes com anemia falciforme em terapia com HU (AFHU) e pacientes com doença falciforme SC (DFSC). Teste de *Kruskal Wallis*.65
- Figura 2.** Porcentagem de plaquetas positivas para a proteína LIGHT em indivíduos controle (CON), pacientes com anemia falciforme (AF) e pacientes com anemia falciforme em terapia com HU (AFHU), em condição basal e após ativação das plaquetas com ADP (20 μ M). Teste de *Kruskal Wallis*, ** P<0.01 comparado ao controle.71
- Figura 3.** Correlação entre a expressão de LIGHT e a integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$ na sua conformação ativada na superfície das plaquetas de pacientes AF em condição basal (A; R=0.649, P=0.002) e após ativação dessas células com ADP (B; R=0.483, P=0.03). Teste de *Spearman*.72
- Figura 4.** Correlação entre a expressão de LIGHT e P-selectina na superfície das plaquetas de pacientes AF em condição basal (A; R=0.188, P >0.05) e após ativação dessas células com ADP (B; R=0.502, P =0.03). Teste de *Spearman*.72
- Figura 5.** Porcentagem de plaquetas positivas para a proteína CD40L em indivíduos controle (CON), pacientes com anemia falciforme (AF) e pacientes com anemia falciforme em terapia com HU (AFHU). Teste de *Kruskal Wallis*, P>0.05 comparado ao controle.73
- Figura 6.** Plaquetas lavadas de controles e pacientes AF foram estimuladas ou não com ADP (20 μ M) ou colágeno (10 μ g/mL) durante 90 minutos. A concentração de sLIGHT presente no sobrenadante foi determinada por ELISA. Teste de *Wilcoxon*.74
- Figura 7.** Plaquetas lavadas de controles e pacientes AF foram estimuladas ou não com ADP (20 μ M) ou colágeno (10 μ g/mL) durante 90 minutos. A concentração de sCD40L presente no sobrenadante foi determinada por ELISA. Teste de Mann Whitney e teste de Wilcoxon, respectivamente.75
- Figura 8.** Correlação entre a secreção de sLIGHT e sCD40L por plaquetas de pacientes AF em condição basal (A; R=0.654, P=0.03) e após ativação dessas células com colágeno (B; R=0.775, P=0.005). Teste de *Spearman*.76
- Figura 9.** Concentração de DcR3 no plasma de indivíduos controle (CON), pacientes com anemia falciforme (AF) e pacientes com anemia falciforme em tratamento com hidroxiureia (AFHU). Teste de *Kruskal Wallis*, *P<0.05 comparado ao controle.77
- Figura 10.** Expressão basal e após estímulo com ADP dos receptores HVEM (A), LT β R (B) e CD40 (C) na superfície de plaquetas de indivíduos controles (CON), pacientes com anemia falciforme (AF) e pacientes com anemia falciforme em tratamento com hidroxiureia (AFHU). Teste de *Kruskal Wallis*, P<0.01, coparado ao grupo AF; * P<0.05, ** P<0.01, *** P<0.001, comparado ao controle.78

Figura 11. Expressão gênica de LIGHT (A), HVEM (B; Teste de Kruskal-Wallis seguido de Dunns, *P<0.05), LTβR (C), CD40L (D) e CD40 (E; Teste de *Kruskal Wallis*, *P<0.05) em neutrófilos de indivíduos controle (CON, n=5) e pacientes com anemia falciforme (AF, n=8; AFHU, n=11).80

Figura 12. Porcentagem de neutrófilos que expressam LIGHT (A), HVEM (B), LTβR (C), CD40L (D) e CD40 (E) em pacientes com anemia falciforme (AF, n = 8), pacientes com anemia falciforme em terapia com hidroxiureia (AFHU, n = 15) e indivíduos controle (CON, n = 13). A expressão dessas moléculas foi avaliada pelo método de citometria de fluxo e a população de neutrófilos foi identificada utilizando gráficos “*dot plot*” SSC x FSC (*side scatter x forward scatter*). Teste de *Kruskal Wallis*, * P<0.05.....82

Figura 13. Expressão dos genes que codificam LIGHT (A), HVEM (B), LTβR (C), CD40L (D) e CD40 (E) em células mononucleares de indivíduos controles (CON, n = 6), pacientes com anemia falciforme (AF, n = 13) e pacientes com anemia falciforme em terapia com hidroxiureia (AFHU, n = 15). Teste de *Kruskal Wallis*, **P<0.01.84

Figura 14. Porcentagem de linfócitos que expressam LIGHT (A), HVEM (B), LTβR (C), CD40L (D) e CD40 (E) em indivíduos controles (CON, n = 14), pacientes com anemia falciforme (AF, n = 9) e pacientes com anemia falciforme em terapia com hidroxiureia (AFHU, n = 16). A expressão dessas moléculas foi avaliada pelo método de citometria de fluxo e a população de linfócitos foi identificada utilizando gráficos “*dot plot*” SSC x CD3 (*side scatter x CD3*). Teste de *Kruskal Wallis*, * P<0.05, ** P<0.01, *** P<0.001, comparado ao grupo controle.86

Figura 15. Porcentagem de monócitos que expressam LIGHT (A), HVEM (B), LTβR (C), CD40L (D) e CD40 (E e F) em indivíduos controles (CON; n = 14) e pacientes com anemia falciforme (AF, n = 9; AFHU, n = 16; AF + AFHU, n = 25). A expressão dessas moléculas foi avaliada pelo método de citometria de fluxo e a população de monócitos foi identificada utilizando gráficos “*dot plot*” SSC x CD14. Teste de *Kruskal Wallis* e teste de *Mann Whitney*, *P<0.05, comparado ao grupo controle.....87

Figura 16. Expressão da molécula CD66b em neutrófilos controle em condição basal e após incubação com plaquetas de indivíduos controles (PLQs CON) e pacientes com anemia falciforme (PLQs AF+AFHU). Neutrófilos e plaquetas foram incubados por 1 hora e a expressão de CD66b foi avaliada por citometria de fluxo. Expressão relatada como Média de intensidade de fluorescência (MIF). P>0,05; ANOVA (*Repeated measures*) seguido pelo teste de *Bonferroni*.89

Figura 17. Expressão da integrina CD11a (subunidade da LFA-1) na sua conformação ativada em neutrófilos controle em condição basal e após incubação com plaquetas de indivíduos controles (PLQs CON) e pacientes com anemia falciforme (PLQs AF+AFHU). Neutrófilos e plaquetas foram incubados por 15 minutos e a expressão de CD11a foi avaliada por citometria de fluxo. Expressão relatada como Média de intensidade de fluorescência (MIF). P>0,05; ANOVA (*Repeated measures*) seguido pelo teste de *Bonferroni*.....89

Figura 18. Expressão da integrina CD11b (subunidade da Mac-1) na sua conformação ativada em neutrófilos controle em condição basal e após incubação com plaquetas de indivíduos controles (PLQs CON) e pacientes com anemia falciforme (PLQs AF+AFHU). Neutrófilos e plaquetas foram incubados por 15 minutos e a expressão de CD11b foi avaliada por citometria de fluxo. Expressão relatada como Média de intensidade de fluorescência (MIF). $P>0,05$; ANOVA (*Repeated measures*) seguido pelo teste de *Bonferroni*.....90

Figura 19. Porcentagem de linfócitos que expressam ICAM-1 (CD54) em condição basal e após incubação com plaquetas de indivíduos controles (PLQs CON) e plaquetas de pacientes com anemia falciforme (PLQs AF+AFHU). Linfócitos e plaquetas foram incubados por 1 hora e a expressão de ICAM-1 foi avaliada por citometria de fluxo. $P>0,05$; ANOVA (*Repeated measures*) seguido pelo teste de *Bonferroni*.....91

Figura 20. Porcentagem de linfócitos que expressam CD69 em condição basal e após incubação com plaquetas de indivíduos controles (PLQs CON) e plaquetas de pacientes com anemia falciforme (PLQs AF+AFHU). Linfócitos e plaquetas foram incubados por 1 hora e a expressão de CD69 foi avaliada por citometria de fluxo. ANOVA (*Repeated measures*) seguido pelo teste de *Bonferroni*.....91

Figura 21. Porcentagem de monócitos positivos para as moléculas CD14 e CD16 (monócitos pró-inflamatórios) no sangue periférico de indivíduos controles (CON), pacientes com anemia falciforme (AF) e pacientes com anemia falciforme em terapia com HU (AFHU). Após separação das células mononucleares a expressão de CD14 e CD16 foi avaliada por citometria de fluxo. Teste de *Kruskal Wallis*.....93

Figura 22. Efeito da incubação de plaquetas de controles (PLQs CON) e de pacientes com anemia falciforme (PLQs AF+AFHU) na expressão das moléculas CD14 e CD16 em monócitos isolados de indivíduos controle. Monócitos e plaquetas foram incubados por 1 hora e a expressão de CD14 e CD16 foi avaliada por citometria de fluxo. ANOVA (*Repeated measures*) seguido pelo teste de *Bonferroni*.....93

Figura 23. Expressão da integrina CD11b em monócitos isolados de indivíduos controle em condição basal e após incubação com plaquetas de controles (PLQs CON) e pacientes com anemia falciforme (PLQs AF+AFHU). Monócitos e plaquetas foram incubados por 1 hora e a expressão de CD11b foi avaliada por citometria de fluxo. Expressão relatada como Média de intensidade de fluorescência (MIF). $P>0,05$; ANOVA (*Repeated measures*) seguido pelo teste de *Bonferroni*.94

Figura 24. Porcentagem de monócitos que expressam fator tecidual (FT) em condição basal e após incubação com plaquetas de indivíduos controles (PLQs CON) e pacientes com anemia falciforme (PLQs AF+AFHU). Monócitos e plaquetas foram incubados por 1 hora e a expressão de FT foi avaliada por citometria de fluxo. $P>0,05$; ANOVA (*Repeated measures*) seguido pelo teste de *Bonferroni*.....94

Figura 25. Porcentagem de HUVECs que expressam VCAM-1 (A) e E-selectina (B) em condição basal e após incubação com plaquetas de indivíduos controles (PLQs CON) e de pacientes com anemia falciforme (PLQs AF+AFHU). HUVECs foram cultivadas por 24

horas (37°C) na presença de plaquetas (3×10^8 PLQs/mL) e a expressão de E-selectina e VCAM-1 foi avaliada por citometria de fluxo.95

Figura 26. Porcentagem de HUVECs que expressam ICAM-1 em condição basal e após incubação com plaquetas de indivíduos controles (PLQs CON) e de pacientes com anemia falciforme (PLQs AF+AFHU). HUVECs foram cultivadas por 24 horas (37°C) na presença de plaquetas (3×10^8 PLQs/mL) e a expressão de ICAM-1 foi avaliada por citometria de fluxo. ANOVA (*Repeated measures*) seguido pelo teste de *Bonferroni*.96

Figura 27. Expressão da molécula de adesão ICAM-1 nas HUVECs em condição basal, após incubação com plaquetas de pacientes com anemia falciforme e na presença ou ausência de anticorpos anti-LIGHT e anti-CD40L. HUVECs e plaquetas foram co-cultivadas por 24 horas (37°C) e a expressão de ICAM-1 foi avaliada por citometria de fluxo. ANOVA (*Repeated measures*) seguido pelo teste de *Bonferroni*.97

Figura 28. Concentração plasmática de sLIGHT em indivíduos controle (CON), pacientes com anemia falciforme (AF), pacientes com anemia falciforme em terapia com HU (AFHU). Teste de *Kruskal Wallis*.100

Figura 29. Concentração plasmática de sCD40L em indivíduos controle (CON), pacientes com anemia falciforme (AF), pacientes com anemia falciforme em terapia com HU (AFHU). Teste de *Kruskal Wallis*.100

Figura 30. Concentração plasmática de sCD40L em pacientes com anemia falciforme que nunca apresentaram Síndrome Torácica Aguda (STA-) e pacientes com histórico de Síndrome Torácica Aguda (STA+). Teste de *Mann Whitney*.102

Figura 31. Expressão de P-selectina na superfície de plaquetas de indivíduos controles (CON), pacientes com anemia falciforme (AF) e pacientes com anemia falciforme em tratamento com hidroxiureia (AFHU). Teste de *Kruskal Wallis*, * $P < 0.05$, comparado ao controle.112

Figura 32. Expressão da integrina $\alpha\text{IIb}\beta 3$ na sua conformação ativada na superfície de plaquetas de indivíduos controles (CON), pacientes com anemia falciforme (AF) e pacientes com anemia falciforme em tratamento com hidroxiureia (AFHU). Teste de *Kruskal Wallis*.113

Figura 33. Possível papel das plaquetas e seus mediadores inflamatórios, LIGHT e CD40L, na ativação de leucócitos e células endoteliais. As plaquetas, quando ativadas, expressam e secretam as citocinas LIGHT e CD40L. Essas citocinas, na sua forma solúvel ou expressas na superfície das plaquetas, podem induzir uma resposta inflamatória nas células endoteliais através da regulação da expressão de moléculas de adesão e da produção de quimiocinas, gerando sinais para o recrutamento de leucócitos. LIGHT e CD40L, derivados das plaquetas, também podem interagir com os leucócitos, promovendo a ativação dessas células e o aumento da suas propriedades adesivas. Essas interações entre plaquetas-endotélio e plaquetas-leucócitos parecem ter um papel importante na propagação da inflamação na anemia falciforme.132

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	29
1.1 Anemia Falciforme - Aspectos Gerais	31
1.2 Classificação	31
1.3 Inflamação crônica na anemia falciforme	32
1.4 Crise vaso-oclusiva	32
1.5 Hidroxiureia	33
1.6 Plaquetas e vaso-oclusão	34
1.7 CD40L	35
1.8 LIGHT	36
2. JUSTIFICATIVA	39
3. OBJETIVOS	43
3.1 Objetivos gerais	45
3.2 Objetivos específicos	45
4. CASUÍSTICA E ASPECTOS ÉTICOS	47
4.1 Casuística	49
4.2 Aspectos éticos da pesquisa	49
5. METODOLOGIA	51
5.1 Separação de plasma livre de plaquetas	53
5.2 <i>Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay</i> - ELISA	53
5.3 Separação e ativação de plaquetas	53
5.4 Separação de neutrófilos e células mononucleares	54
5.5 Incubação de leucócitos com plaquetas	54
5.6 Cultivo de células endoteliais e co-cultura com plaquetas	54
5.7 Citometria de fluxo	55
5.7.1 Plaquetas	55
5.7.2 Leucócitos	55
5.7.3 Células endoteliais	56
5.8 Extração, quantificação e eletroforese de mRNA e síntese de cDNA	56
5.9 PCR em tempo real	57

5.10 Análise estatística	58
6.RESULTADOS	61
6.1 Dados hematológicos e níveis plasmáticos de sLIGHT e sCD40L em pacientes com anemia falciforme	63
6.2 Associação entre a elevada concentração plasmática de LIGHT e velocidade de regurgitação da tricúspide na anemia falciforme.....	68
6.3 Correlação entre os níveis plasmáticos de LIGHT, CD40L, proteínas inflamatórias e marcadores de vasculopatia na anemia falciforme	69
6.4 Expressão de LIGHT na superfície de plaquetas e correlação com a ativação plaquetária.	71
6.5 Expressão de CD40L na superfície de plaquetas de pacientes com anemia falciforme e indivíduos controles.....	73
6.6 Secreção de sLIGHT e sCD40L por plaquetas de pacientes com anemia falciforme e indivíduos controle	74
6.7 Correlação entre a secreção de sLIGHT e sCD40L em plaquetas de pacientes com anemia falciforme	76
6.8 Avaliação dos níveis plasmáticos do receptor DcR3 em pacientes com anemia falciforme e indivíduos controle.....	76
6.9 Avaliação da expressão dos receptores HVEM, LT β R, e CD40 na superfície de plaquetas de pacientes com anemia falciforme e indivíduos controle	77
6.10 Avaliação da expressão gênica de LIGHT, HVEM, LT β R, CD40L e CD40 em neutrófilos.....	79
6.11 Avaliação da expressão proteica de LIGHT, HVEM, LT β R, CD40L e CD40 na superfície de neutrófilos	81
6.12 Avaliação da expressão gênica de LIGHT, HVEM, LT β R, CD40L e CD40 em células mononucleares.....	83
6.13 Avaliação da expressão das proteínas LIGHT, HVEM, LT β R, CD40L e CD40 na superfície de linfócitos e monócitos	85
6.14 Capacidade das plaquetas de ativar os neutrófilos	88
6.15 Capacidade das plaquetas de ativar os linfócitos	90
6.16 Capacidade das plaquetas de ativação dos monócitos.....	92
6.17 Capacidade das plaquetas de ativação de células endoteliais.....	95
6.18 Avaliação do papel de LIGHT e CD40L na ativação mediada por plaquetas de células endoteliais.....	96
6.19 Avaliação dos níveis plasmáticos de sLIGHT e sCD40L no coorte de pacientes com anemia falciforme de Londres – Reino Unido	98

6.19.1 Dados hematológicos e níveis plasmáticos de sLIGHT e sCD40L em pacientes com anemia falciforme	98
6.19.2 Associação entre a elevada concentração plasmática de sCD40L e a Síndrome Torácica Aguda na anemia falciforme	101
6.19.3 Correlação entre os níveis plasmáticos de sLIGHT, sCD40L, citocinas inflamatórias e Trombospondina-1 na anemia falciforme	103
6.19.4 Correlação dos níveis plasmáticos de sLIGHT com parâmetros hematológicos	106
6.19.5 Correlação dos níveis plasmáticos de sLIGHT com variáveis laboratoriais ...	106
6.19.6 Correlação dos níveis plasmáticos de sCD40L com parâmetros hematológicos	109
6.19.7 Correlação dos níveis plasmáticos de sCD40L com variáveis laboratoriais ...	109
6.19.8 Avaliação da expressão de marcadores de ativação plaquetária nos pacientes com anemia falciforme	112
7. DISCUSSÃO	115
7.1 Produção das citocinas LIGHT e CD40L na anemia falciforme.....	117
7.2 Papel das citocinas LIGHT e CD40L na fisiopatogenia da anemia falciforme.....	121
7.3 Efeitos da Hidroxiureia.....	123
7.4 Papel das plaquetas e seus mediadores inflamatórios, LIGHT e CD40L, na ativação de leucócitos e células endoteliais	124
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	133
ANEXOS	147
APÊNDICE	151

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1 Anemia Falciforme - Aspectos Gerais

A anemia falciforme é uma hemoglobinopatia hereditária resultante de uma mutação puntiforme no gene da beta-globina. Essa mutação leva à substituição do ácido glutâmico por uma valina na sexta posição dessa cadeia, formando uma hemoglobina com propriedades físico-químicas anormais, conhecida como HbS (Brittenham *et. al.*, 1985). Com a desoxigenação das hemácias, as moléculas de HbS sofrem agregação e polimerização. Após esse processo, a hemoglobina que se apresentava na forma de um líquido de fluxo livre passa a ter o aspecto de um gel viscoso, resultando na formação de fibras com consequente deformação dos eritrócitos, que adquirem uma forma de foice (Cotran *et. al.*, 2000). A substituição de um único aminoácido na estrutura da hemoglobina compreende a base molecular para a anemia falciforme, mas a evolução clínica correspondente à esta doença é extraordinariamente complicada e afeta vários órgãos, como os rins, baço e pulmão. Pacientes com AF sofrem com uma anemia hemolítica severa, recorrentes crises vaso-oclusivas, além de uma disfunção crônica dos órgãos (Rees *et. al.*, 2010).

1.2 Classificação

O termo doença falciforme é utilizado para se referir a todos os diferentes genótipos que causam a síndrome clínica característica, enquanto que anemia falciforme, refere-se especificamente à homozigose do alelo β^S , a forma mais comum da doença falciforme. Em populações de origem étnica Africana, a anemia falciforme geralmente é responsável por 70% dos casos de doença falciforme, sendo a maioria do restante dos casos doença da hemoglobina SC (doença falciforme SC). Essa variante da doença falciforme resulta da co-hereditariedade dos alelos β^S e β^C e possui uma gravidade clínica intermediária (Nagel *et. al.*, 2003). Devido ao perfil étnico da população brasileira, a incidência da doença falciforme varia de 1 em cada 650 a 4 mil nascimentos. Nos estados com maior concentração de afro descendentes a prevalência desta doença é mais alta, se tornando um grave problema de saúde pública no Brasil (Portal da Saúde – Triagem Neonatal - http://portal.saude.gov.br/portal/saude/area.cfm?id_area=1061).

1.3 Inflamação crônica na anemia falciforme

A anemia falciforme é acompanhada por um estado inflamatório crônico que contribui com várias complicações (Hagar e Vichinsk, 2008) e o endotélio possui um papel fundamental na propagação e na perpetuação dessa inflamação. As células endoteliais, quando ativadas por estímulos decorrentes da hipóxia/reperfusão ou da hemólise intravascular, além de exibirem uma expressão anormal de moléculas de adesão, adquirem um fenótipo pró-coagulante e liberam uma grande quantidade de citocinas e quimiocinas que são responsáveis pela ativação e o recrutamento de plaquetas e leucócitos (de Franceschi *et al.*, 2003; Setty *et al.*, 2008; Galley *et al.*, 2004; Croizat *et al.*, 1994). As plaquetas e os leucócitos também respondem aos estímulos gerados pelas células endoteliais produzindo uma variedade de mediadores inflamatórios. Alguns desses mediadores, como fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e a interleucina 1 beta (IL-1 β), são potentes ativadores do endotélio (Francis Jr *et al.*, 1992), desencadeando um ciclo vicioso de ativação, adesão celular e produção de moléculas inflamatórias, culminando no estado crônico de inflamação que é fundamental para o processo vaso-oclusivo (Conran e Costa, 2009).

1.4 Crise vaso-oclusiva

São muitas as complicações clínicas que estão relacionadas à anemia falciforme. Indivíduos com esta doença sofrem com complicações neurológicas consequentes de acidente vascular cerebral, infecções recorrentes, síndrome torácica aguda e hipertensão pulmonar. Dentre estas complicações, a crise vaso-oclusiva é a manifestação mais comum, sendo uma das principais causas de morbidade na anemia falciforme. A oclusão da microcirculação em áreas como ossos longos, costelas e veias mesentéricas causam dor intensa, acompanhada por uma inflamação local (Rees *et al.*, 2010).

A oclusão vascular é causada pela retenção de hemácias e leucócitos na microcirculação, causando a obstrução dos vasos e isquemia tecidual. Embora esse processo necessite da polimerização da HbS, o evento que desencadeia essa obstrução é muitas vezes inflamatório (Frenette 2002; Turhan *et al.*, 2002). Ciclos de isquemia e reperfusão causam estresse oxidativo, aumentando a expressão de moléculas de adesão nas

células endoteliais e aumentando a síntese de citocinas inflamatórias que podem causar leucocitose (Belcher *et. al.*, 2003 e 2005).

Outro mecanismo importante deste processo é a hemólise intravascular. A hemoglobina livre no plasma ocasiona a produção de espécies reativas do oxigênio, que são potentes captadores de óxido nítrico, diminuindo a biodisponibilidade desse gás solúvel na circulação (Reiter *et. al.*, 2002). O óxido nítrico é um potente vasodilatador, produzido principalmente pelo endotélio, que possui a capacidade de inibir a ativação das células endoteliais, impedindo a regulação da expressão de moléculas de adesão, como a molécula de aderência às células vasculares 1 (VCAM-1), molécula de aderência intercelular 1 (ICAM-1) e selectinas (De Caterina *et. al.*, 1995).

A redução dos níveis de óxido nítrico juntamente com o aumento de mediadores inflamatórios e fatores pró-coagulantes na circulação induzem a ativação do endotélio vascular (Conran *et al.*, 2009), facilitando a adesão de hemácias e leucócitos que também apresentam um aumento das suas propriedades adesivas (Canalli *et. al.*, 2007; Gambero *et. al.*, 2007). Esses eventos provocam a obstrução do fluxo sanguíneo, formando agregados heterocelulares que diminuem o trânsito das células na microcirculação. O fluxo lento expõe as hemácias à hipóxia aumentando a polimerização da HbS e culminando na vaso-occlusão (Stuart e Nagel, 2004).

1.5 Hidroxiureia

A polimerização da HbS desoxigenada é o evento primário indispensável na patogênese da doença falciforme. A taxa e extensão da polimerização da HbS é proporcional ao grau de desoxigenação das células vermelhas, pH, assim como à concentração intracelular de HbS e hemoglobina fetal (HbF). A presença de HbF nas hemácias reduz efetivamente a concentração de HbS, diminuindo a falcização das células (Noguchi *et. al.*, 1988).

Dentre as drogas citotóxicas que aumentam a concentração da HbF, a hidroxiureia (HU) vem sendo amplamente utilizada no tratamento da doença falciforme devido ao seu baixo efeito tóxico (Platt *et. al.*, 1984) e também ao seu efeito nas complicações clínicas desta doença, como a diminuição da frequência de crises vaso-oclusivas, síndrome torácica aguda e da necessidade de transfusão sanguínea (Charache *et.al.*, 1995). Com o tempo,

vários outros efeitos benéficos foram sendo atribuídos a essa droga, incluindo a diminuição da contagem de plaquetas e leucócitos, a diminuição da ativação do endotélio (Odièvre *et. al.*, 2007), mudanças na expressão de moléculas de adesão (Canalli *et. al.*, 2008; Gambero *et. al.*, 2007) e a geração de óxido nítrico (Lou *et. al.*, 2009). Em geral, a hidroxiureia é bem tolerada e seu principal efeito colateral, a curto prazo, é uma mielossupressão dose dependente. Além de muitos pacientes não responderem ao tratamento, existe uma preocupação sobre a possibilidade da hidroxiureia predispor a doenças malignas a longo prazo, embora haja pouca evidência para apoiar esta teoria (Lankron *et. al.*, 2008).

1.6 Plaquetas e vaso-oclusão

As plaquetas são pequenos fragmentos discoides formados na medula óssea a partir dos megacariócitos. Apesar de não possuírem núcleo e não poderem se reproduzir, as plaquetas apresentam muitas características funcionais de células completas (Guyton e Hall, 2002). A função das plaquetas como mediadoras da hemostasia e trombose é bastante conhecida e documentada, mas atualmente várias evidências têm sugerido um importante papel dessas células na inflamação (Klinger *et. al.*, 2002). As plaquetas quando ativadas expressam e secretam mediadores inflamatórios que induzem uma resposta inflamatória em leucócitos e células endoteliais, estas células, por sua vez, também produzem uma série de mediadores que são capazes de ativar as próprias plaquetas (Gawaz *et. al.*, 1998; Srivastava *et. al.*, 1990). Essa versatilidade das plaquetas em interagir com diferentes tipos celulares parece desempenhar um importante papel na fisiopatogenia da anemia falciforme.

Uma ativação plaquetária aumentada tem sido demonstrada em pacientes com anemia falciforme mesmo quando esses pacientes não estão em crise, entretanto, as consequências dessa ativação ainda não estão muito bem esclarecidas (Villagra *et. al.*, 2007). De acordo com resultados publicados pelo nosso grupo de pesquisa, as plaquetas, na anemia falciforme, possuem uma capacidade aumentada de aderirem a componentes da parede vascular e o contato físico entre essas células, *in vitro*, promove a expressão de moléculas de adesão e a produção de citocinas inflamatórias nas células endoteliais (Proença-Ferreira *et. al.*, 2010 e Proença-Ferreira *et. al.*, no prelo).

1.7 CD40L

Várias citocinas derivadas de plaquetas parecem estar envolvidas na inflamação mediada por plaquetas (Klinger *et. al.*, 2002). Recentemente, bastante atenção tem sido focada no papel do CD40 ligand (CD40L). CD40L é uma proteína transmembrana, pertencente à família do fator de necrose tumoral (TNF), que tem como principal receptor o CD40. A interação CD40-CD40L foi inicialmente pensada ser apenas um modulador imunológico responsável pela proliferação e diferenciação de linfócitos (Spriggs *et.al.*, 1992; Schonbeck e Libby, 2001). No entanto, vários trabalhos demonstraram que o CD40L desempenha um papel muito mais amplo, sendo bastante importante na fisiopatogenia de doenças vasculares, como a aterosclerose (Schonbeck *et. al.*, 2000).

Tanto CD40 como CD40L estão expressos em uma grande variedade de células do sistema imune (linfócitos, monócitos, células dendríticas e neutrófilos) e também em outros tipos celulares como as células endoteliais, células do músculo liso e células epiteliais (Schonbeck *et. al.*, 2001). Além disso, já foi demonstrado que as plaquetas são a principal fonte de CD40L na circulação (Henn *et. al.*, 1998).

A sinalização CD40-CD40L induz a proliferação, diferenciação e ativação das células, a qual é caracterizada pela liberação de uma vasta gama de citocinas (IL-1 β , IL-2, TNF- α , interferon- γ) e fatores de crescimento (VEGF) que exercem vários efeitos pró e anti-inflamatórios (Tedgui e Mallat, 2006; Kleemann *et. al.*, 2008). A interação CD40-CD40L também resulta na expressão de moléculas de adesão (ICAM-1, VCAM-1, P-selectina) e quimiocinas (MCP-1, RANTES) que regula a migração de diferentes tipos celulares (Charo e Ransohoff, 2006; Zernecke *et. al.*, 2008).

A molécula de CD40L, como outros membros da família do TNF, também pode ser detectada na forma solúvel (sCD40L), a qual é liberada principalmente pelas plaquetas após estimulação. sCD40L foi encontrada elevada e biologicamente ativa na anemia falciforme, sugerindo uma potencial contribuição de mediadores derivados de plaquetas na inflamação crônica e na atividade trombótica que ocorrem na anemia falciforme (Lee *et. al.*, 2006).

1.8 LIGHT

Outro mediador que parece estar envolvido na inflamação mediada por plaquetas é a citocina LIGHT (*Lymphotoxin-like, exhibits inducible expression, and competes with HSV glycoprotein D (gD) for HVEM, a receptor expressed by T lymphocytes; TNFSF14*). Essa proteína, que pertence à família do TNF, tem um papel importante na regulação da resposta imune e possui três receptores, o *herpes virus entry mediator* (HVEM), o *lymphotoxin- β receptor* (LT β R) e o *soluble decoy receptor 3* (DcR3). As funções das vias de sinalização associadas a estes receptores são geralmente específicas ao contexto da célula alvo, devido à sua expressão em uma grande variedade de tipos celulares (Granger e Rickert, 2003). Na maioria dos casos, a ligação LIGHT/HVEM ativa seletivamente a via do NF- κ B, iniciando a transcrição de genes envolvidos na sobrevivência e crescimento celular e na inflamação. Alguns estudos mostram que essa via também atua como moduladora da resposta de células T e na co-estimulação da ativação dessas células (Ware, 2009). As atividades da via de sinalização LIGHT/LT β R incluem a indução *in vitro* da apoptose, a produção de várias citocinas e a ativação de células dendríticas e do estroma (Ware, 2008). E o DcR3, que é um receptor solúvel produzido por diferentes tipos celulares, tem a capacidade de neutralizar os efeitos biológicos de LIGHT (Lin e Hsieh, 2011).

LIGHT é biossintetizada como um homotrímero e existe em três formas físicas que são geradas por splicing alternativo ou clivagem enzimática. Quando o gene é codificado por inteiro dá origem a uma glicoproteína transmembrana do tipo II típica da família do TNF. Foi descrita também uma isoforma de splicing alternativo que codifica uma molécula não glicosilada sem o domínio transmembranar que é retida no citoplasma das células T ativadas. Uma terceira forma de LIGHT é solúvel (sLIGHT) e proveniente da clivagem dessa proteína da superfície das células mediante a atividade de metaloproteinases (Granger *et. al.*, 2001; Morel *et. al.*, 2000). A diferente localização celular destas três formas de LIGHT implica que elas podem transmitir funções biológicas distintas.

LIGHT é produzida por leucócitos e, de acordo com alguns estudos, também pode ser sintetizada por plaquetas (Otterdal *et. al.*, 2006; Celik *et. al.*, 2007; Celik *et. al.*, 2009). Otterdal e colaboradores demonstraram que as plaquetas, quando ativadas, são capazes de liberar a forma solúvel de LIGHT através de um mecanismo dependente da ativação da GP IIb/IIIa e da ação de metaloproteinases. Além disso, também mostraram que sLIGHT

derivado de plaquetas é biologicamente ativa e pode induzir uma resposta inflamatória em monócitos e células endoteliais induzindo a regulação de moléculas de adesão e a liberação de quimiocinas (Otterdal *et. al.*, 2006). LIGHT surgiu como um potencial alvo terapêutico em várias doenças inflamatórias, como a aterosclerose, pois há evidências de que a interação LIGHT/HVEM pode mediar a produção de mediadores pró-aterogênicos por monócitos e células endoteliais, bem como a migração de macrófagos e a proliferação de células do músculo liso (Wang e Fu, 2005; Ware, 2009). Essas evidências sugerem que LIGHT também pode estar participando da inflamação crônica presente na anemia falciforme.

2. JUSTIFICATIVA

2. JUSTIFICATIVA

Atualmente a anemia falciforme é conhecidamente caracterizada por um estado inflamatório crônico, mas os mecanismos que induzem a produção de mediadores inflamatórios e a participação das plaquetas neste processo são pouco conhecidos. As proteínas inflamatórias estão envolvidas em vários mecanismos que contribuem para a patogenia da vaso-oclusão, como na ativação do endotélio, leucócitos e eritrócitos. Desta forma, a avaliação da produção de LIGHT e CD40L pelas plaquetas de pacientes com anemia falciforme e a investigação do envolvimento dessas células na ativação dos leucócitos e células endoteliais daria uma melhor indicação do papel das plaquetas e seus mediadores inflamatórios na fisiopatogenia da anemia falciforme e no processo vaso-oclusivo.

3. OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivos gerais

Investigar a produção e a expressão de LIGHT e CD40L em plaquetas e a presença desses mediadores inflamatórios no plasma de pacientes com anemia falciforme, em terapia ou não com HU.

Investigar a contribuição de LIGHT e CD40L para a resposta inflamatória mediada por plaquetas na anemia falciforme.

3.2 Objetivos específicos

- a. Quantificar os níveis de LIGHT e CD40L no plasma de pacientes com anemia falciforme e controles.
- b. Quantificar os níveis de LIGHT e CD40L liberados por plaquetas de pacientes com anemia falciforme e controles.
- c. Avaliar a expressão de LIGHT, CD40L e seus respectivos receptores na superfície das plaquetas de pacientes e controles por citometria de fluxo.
- d. Avaliar a expressão gênica e proteica de LIGHT, CD40L e seus respectivos receptores em neutrófilos, monócitos e linfócitos de pacientes e controles por PCR em tempo real e citometria de fluxo.
- e. Investigar a capacidade das plaquetas em ativar neutrófilos, monócitos, linfócitos e células endoteliais.
- f. Avaliar o papel de LIGHT e CD40L, derivado de plaquetas, na ativação de neutrófilos, monócitos, linfócitos e células endoteliais.
- g. Avaliar os níveis plasmáticos de LIGHT e CD40L no *cohort* de pacientes com anemia falciforme de Londres – Reino Unido.

4. CASUÍSTICA E ASPECTOS ÉTICOS

4. CASUÍSTICA E ASPECTOS ÉTICOS

4.1 Casuística

Para o grupo controle foram recrutados indivíduos saudáveis (funcionários, alunos, doadores de sangue do hemocentro da UNICAMP, da Fundação HEMOPE e do King's College Hospital, ou indivíduos voluntários à pesquisa). Estes indivíduos não estavam em uso de medicações anti-inflamatórias, analgésicas ou de anticoagulantes e tinham idade entre 18 e 60 anos.

Os pacientes com anemia falciforme (em terapia ou não com hidroxiureia) e pacientes com doença falciforme SC foram recrutados do Ambulatório de Hemoglobinopatias do Hemocentro da UNICAMP, da Fundação HEMOPE e do King's College Hospital. Estes pacientes foram diagnosticados com anemia falciforme através da técnica de eletroforese de hemoglobinas e estavam sem crises de dor ou transfusões sanguíneas por pelo menos 3 meses antes da data de coleta das amostras.

Os indivíduos do grupo de pacientes com anemia falciforme em terapia com HU (15-30 mg/Kg/dia) estavam em uso desse medicamento por pelo menos 3 meses antes da data de coleta das amostras.

4.2 Aspectos éticos da pesquisa

Este estudo foi aprovado em 24/03/2009 pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, Parecer nº 065/2009, conforme previsto na resolução nº. 196/96 do Conselho Nacional de Saúde (CNS). Os experimentos realizados na Fundação HEMOPE e no King's College London também passaram por avaliação e foram aprovados pelos respectivos Comitês de Ética em Pesquisa. Todos os participantes assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido, previamente aprovado pelo CEP.

5. METODOLOGIA

5. METODOLOGIA

5.1 Separação de plasma livre de plaquetas

O plasma livre de plaquetas (PLP) foi preparado a partir da centrifugação do sangue total, coletado em EDTA, por 15 minutos a 1000 g, 22°C. Em seguida o plasma obtido foi centrifugado mais uma vez por 15 minutos (3000 g, 22 °C) e filtrado por uma unidade filtrante estéril e descartável (Millex GV, Millipore). O plasma foi armazenado a – 80° C até uso em ensaios.

5.2 Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay - ELISA

Os níveis de sLIGHT, sCD40L, sICAM-1, sVCAM-1, DcR3, IL-8, IL-6, MCP-1, TNF- α e Trombospondina-1 (TSP-1) foram determinados no plasma ou no sobrenadante de plaquetas (2×10^8 /mL) utilizando kits de ELISA de alta sensibilidade específicos para detecção de cada proteína (R&D Systems, Minneapolis, MN), seguindo as instruções do fabricante.

5.3 Separação e ativação de plaquetas

Aproximadamente 18 mL de sangue periférico foram coletados em tubos com ACD (Ácido Citrato Dextrose) de indivíduos controles e pacientes com anemia falciforme. Após centrifugação (20 min, 200g, 21°C), o plasma rico em plaquetas (PRP) foi transferido para outro tubo (cerca de 3 mL) com tampão de lavagem (aproximadamente de 5 mL, 140 mM NaCl / 0.5 mM KCl / 12 mM citrato de sódio / 10 mM glicose / 12.5 mM sacarose, pH= 6), e centrifugado por 12 minutos a 800 g, 21°C. O sobrenadante foi descartado e o pellet de plaquetas ressuspensionado cuidadosamente com 500 μ L de solução de Krebs (118 mM NaCl / 25 mM NaHCO₃ / 1.2 mM KH₂PO₄ / 1.7 mM MgSO₄ / 5.6 mM glicose, pH=7,4). A contagem de plaquetas foi realizada no contador automático AcT Diff™ (Beckman & Coulter) e a concentração final foi ajustada de acordo com o experimento a ser realizado.

As plaquetas lavadas, na concentração de 2×10^8 PLQs/mL, foram incubadas ou não com 20 μ M de ADP ou 10 μ g/ml de colágeno humano tipo I (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) a 37°C por 90 minutos, posteriormente o sobrenadante foi separado por centrifugação e armazenado a -80°C até o uso em ensaios.

5.4 Separação de neutrófilos e células mononucleares

O sangue periférico, coletado em tubo contendo heparina, foi submetido a um sistema de gradiente Ficoll-Hypaque de densidades 1.0771g/mL e 1.1191g/mL e centrifugado a 700 g por 30 minutos à temperatura ambiente. Após centrifugação, as camadas de células granulocíticas e células mononucleares foram separadas e lavadas com PBS 1X (pH=7,4). Foi realizada uma lise hipotônica (Solução de amônia - 155mM NH₄CL, 10mM KHCO₃) a fim de romper hemácias contaminantes e após outra etapa de lavagem, as células foram ressuspensas em PBS 1X na concentração de 1x10⁶ células/mL para o uso em ensaios. Apenas amostras com mais de 92% de pureza foram utilizadas nos experimentos. As expressões de LIGHT, HVEM, LTβR, CD40L e CD40 foram avaliadas nessas células pelo método de citometria de fluxo.

5.5 Incubação de leucócitos com plaquetas

Em alguns experimentos, neutrófilos e células mononucleares controles foram incubados com plaquetas (1x10⁸/mL) de pacientes com anemia falciformes ou de indivíduos controles por 15 minutos (neutrófilos) ou 1 hora (neutrófilos e células mononucleares) a 37°C, dependendo do experimento. Após esse período, a ativação dessas células foi observada pelo método de citometria de fluxo analisando a expressão das seguintes moléculas.

- i. Neutrófilos: CD11a (subunidade α da integrina LFA-1) e CD11b (subunidade α da integrina Mac-1) na sua conformação ativada e CD66b.
- ii. Monócitos: CD11b, CD16 (receptor FcγRIIIa) e Fator Tecidual (CD142).
- iii. Linfócitos: CD69 (marcador de ativação de linfócitos) e ICAM-1 (CD54).

5.6 Cultivo de células endoteliais e co-cultura com plaquetas

Células endoteliais da veia umbilical humana (HUVECs), adquiridas da American Type Culture Collection (Manassas, VA, EUA), foram cultivadas em frascos de 25 cm com meio de Ham12K suplementado com ECGSF, HEPES (20mM), penicilina (100U/ml), estreptomicina (100U/ml), fungisone (2.5 µg/ml), glutamina (2mM) e 10% de soro fetal

bovino. As células foram usadas após a 4^o-6^o passagem e mantidas em estufa a 37°C com 5% CO₂. O meio foi substituído a cada dois dias até as células atingirem confluência (3-5 dias).

Após atingirem confluência, as HUVECs foram cultivadas em placas de 12 poços na presença de plaquetas (3x10⁸/mL) de pacientes com anemia falciforme ou de indivíduos controles a 37°C com 5% CO₂, por 24 horas. Em seguida, a ativação dessas células foi observada pelo método de citometria de fluxo analisando a expressão das moléculas de adesão ICAM-1 (CD54), VCAM-1 (CD106) e E-selectina (CD62E).

5.7 Citometria de fluxo

A expressão superficial de proteínas em plaquetas, neutrófilos, monócitos, linfócitos e HUVECs foi medida por imunofluorescência. As análises foram realizadas no citômetro de fluxo FACSCalibur (Becton Dickinson) utilizando o software FACS Diva e em todos os experimentos foi utilizado um anticorpo controle não-específico IgG (AbD SEROTEC). Um total de 10000 eventos foram analisados para cada amostra.

5.7.1 Plaquetas

O PRP (5 µL), obtido por centrifugação do sangue total (200g, 21°C por 20 minutos), foi estimulado ou não com ADP (20 mM, Sigma-Aldrich) por 30 min em temperatura ambiente (TA). Após fixação com paraformaldeído 1% (10 min, TA), as plaquetas foram lavadas e incubadas por 20 min a TA no escuro com os anticorpos anti-LIGHT (PE – R&D Systems), anti-HVEM (APC – R&D Systems), anti-LTβR (PE– R&D Systems), anti-CD40L (FITC – BD Bioscience), anti-CD40 (PE – R&D Systems), anti-CD62P (PE - BD Bioscience) e PAC-1 (FITC - BD Bioscience), anticorpo que reconhece a integrina αIIbβ3 na sua conformação de alta afinidade. As amostras foram lavadas novamente, ressuspensas em 300µL de PBS 1X e analisadas.

5.7.2 Leucócitos

Neutrófilos e células mononucleares isolados (1x10⁶ células/mL) foram incubados por 30 min a 4°C no escuro com os anticorpos anti-LIGHT (PE – R&D Systems), anti-HVEM (APC – R&D Systems), anti-LTβR (PE – R&D Systems), anti-CD40L (FITC – BD

Bioscience), e anti-CD40 (PE – R&D Systems). As amostras de células mononucleares também foram marcadas com os anticorpos anti-CD3 (FITC - BD Bioscience), anti-CD14 (FITC – BD Bioscience) e anti-CD16 (APC – R&D Systems) para diferenciar as populações de linfócitos e monócitos. Após a incubação, as células foram lavadas e ressuspensas em 300µL de PBS 1X para análise. Para a identificação dos linfócitos nas amostras de células mononucleares foram utilizados gráficos “*dot plot*” SSC (*side scatter*) x CD3 e para a identificação dos monócitos foram utilizados gráficos “*dot plot*” SSC (*side scatter*) x CD14.

Nos experimentos de incubação com plaquetas os neutrófilos foram marcados com os anticorpos anti-CD11a (MEM-83 - Abcam), anti-CD11b (FITC - eBioscience), anti-CD66b (FITC – BD Bioscience) e as células mononucleares foram marcadas com anti-CD11b (PE-Cy7 - BD Bioscience), anti-CD142 (PE – BD Bioscience), anti-CD16 (APC – R&D Systems), anti-CD69 (APC – R&D Systems), anti-CD54 (PE - BD Bioscience), anti-CD3 (FITC - BD Bioscience) e anti-CD14 (FITC – BD Bioscience).

5.7.3 Células endoteliais

Um total de 1×10^5 HUVECs foram incubadas com plaquetas em placas de 12 poços. Após 24 horas, as plaquetas foram retiradas e as HUVECs foram removidas das placas utilizando 1 mL de tripsina (0.5 g/L - Sigma-Aldrich) por 3 min a 37°C. Em seguida, as células foram lavadas com PBS (pH 7,4) e incubadas por 30 min a 4°C no escuro com os anticorpos anti-CD54 (PE - BD Bioscience), anti-CD106 (FITC - BD Bioscience) e anti-CD62E (APC - BD Bioscience). Então, as células foram lavadas duas vezes com PBS e posteriormente analisadas.

5.8 Extração, quantificação e eletroforese de mRNA e síntese de cDNA

O mRNA foi extraído de neutrófilos e células mononucleares. Após a separação das células foi adicionado 1mL de Trizol® (Invitrogen Corp. Carlsbad, CA, USA) e as próximas etapas para o isolamento do RNA foram realizadas de acordo com as recomendações do fabricante. A quantificação das amostras de RNA foi feita por espectrofotometria (NanoDrop Technologies, Inc., EUA). A integridade e a qualidade das amostras de RNA total extraídas foram verificadas através de eletroforese em gel de

agarose desnaturante 1.2% com formaldeído. A observação de RNA ribossomais eucarióticos – 28S e 18S numa razão próxima de 2:1 foi indicativo da não degradação das amostras de RNA.

As amostras de RNA obtidas como descrito anteriormente foram tratadas com a enzima DNaseI para remoção de DNA contaminante. A transcrição reversa foi realizada utilizando-se o kit SuperScriptIII (Life Technologies) de acordo com as instruções do fabricante. O cDNA produzido foi armazenado a -20°C até uso em ensaios.

5.9 PCR em tempo real

Esta técnica foi utilizada para quantificar a expressão dos genes que codificam as proteínas LIGHT e CD40L, assim como dos seus receptores. O princípio da técnica é baseado no monitoramento óptico da fluorescência do produto de PCR e como molde foram utilizadas amostras de cDNA. Os *primers* utilizados deste estudo foram desenhados utilizando o programa Primer Express (Applied Biosystems) e estão descritos na Tabela 1.

Tabela 1. Sequência dos *primers* utilizados neste estudo.

Gene	Sequências dos <i>primers</i>
<i>BAC</i>	F = 5'-AGGCCAACCGCGAGAAG-3' R = 5'-ACAGCCTGGATAGCAACGTACA-3'
<i>GAPDH</i>	F = 5'-GCACCTCAAGGCTGAGAAC-3' R = 5'-CCACTTGATTTTGGAGGGATCT-3'
<i>TNFSF14</i> (LIGHT)	F = 5'-CCTGGGAGCAGCTGATACAAG R = 5'-CTGCCGGTCAAGCTGGAGT
<i>TNFRSF14</i> (HVEM)	F = 5'-GTGCAGTCCAGGTTATCGTGTG R = 5'-CAATGTAGGTGCCTGGAGGG
<i>LTBR</i>	F = 5'-GAGCCACCCTTCTCTCTGCA R = 5'-TATGGATGGGCCTTCGGAG
<i>CD40LG</i> (CD40L)	F = 5'- CATAAGTGAGGCCAGCAGTAAAC R = 5'- TGCTCATGGTGTAGTATCCTTTTTC
<i>CD40</i>	F = 5'-CGAAAAATGTCACCCTTGGAC R = 5'-CATCAGTCTTGTGTTGTGCCTGC

F, *primer "forward"*; R, *primer "reverse"*.

A detecção da amplificação em tempo real foi feita no equipamento ABI 5700 Sequence Detector System (Applied Biosystems) por meio do reagente SyberGreen PCR Master Mix (Applied Biosystems). Para confirmar a precisão e reprodutibilidade do PCR em tempo real, a precisão do intra-ensaio foi calculada de acordo com a equação $E^{(-1/\text{slope})}$. As amostras foram analisadas em duplicata e os resultados foram expressos em unidades arbitrárias (UA) da expressão gênica quando comparados com os genes controles.

5.10 Análise estatística

Os dados foram plotados em planilhas do Excel ou no software GraphPad Prism e para as análises estatísticas inicialmente foram realizados testes para verificação da distribuição normal dos valores (Kolmogorov-Smirnov), utilizando o programa Instat (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA). Os resultados foram expressos como média $\pm$ erro da média ou mediana $\pm$ desvio padrão. Após verificação da distribuição dos

valores, foram feitos testes pareados (paramétricos ou não-paramétricos) para verificação da ação das plaquetas ou das proteínas inflamatórias LIGHT e CD40L em uma mesma amostra. As comparações entre os grupos de pacientes e controle foram feitas pelo teste de *Kruskall Wallis*, seguido de *Dunn* (não-paramétrico). Para comparações entre dois grupos foi utilizado o teste de *Mann Whitney* (não-paramétricos). Para as análises de correlação foi utilizado o teste de *Spearman* (não-paramétricos). O teste exato de *Fisher* foi usado para comparar a incidência de complicações clínicas nos grupos de pacientes. Valores de $P < 0,05$ foram considerados como estatisticamente significantes.

6.RESULTADOS

6. RESULTADOS

6.1 Dados hematológicos e níveis plasmáticos de sLIGHT e sCD40L em pacientes com anemia falciforme

Foi coletado amostras de plasma de cinquenta e sete pacientes com anemia falciforme que não faziam uso de hidroxiureia (AF), quarenta e seis pacientes com anemia falciforme em terapia com HU (AFHU), vinte e dois pacientes com doença falciforme SC que não faziam uso de hidroxiureia (DFSC) e quarenta e sete indivíduos controles (CON). Pacientes e controles foram recrutados do Hemocentro de Campinas e da Fundação HEMOPE de Pernambuco. Os dados hematológicos e características dos pacientes estão resumidos na Tabela 2. Os níveis plasmáticos de sLIGHT e sCD40L foram dosados em controles e pacientes pelo método de ELISA e observou-se que os níveis de sLIGHT estavam significativamente elevados nos grupos AF, AFHU e DFSC em comparação com o grupo controle. Já a concentração de sCD40L estava significativamente aumentada apenas nos grupos AF e AFHU quando comparados ao grupo controle. Embora seja conhecido alguns efeitos anti-inflamatórios da hidroxiureia, não foi observada qualquer alteração nos níveis de sLIGHT e sCD40L no grupo de pacientes em terapia com essa droga (Fig.1). Nenhuma correlação significativa foi encontrada entre a concentração plasmática de sLIGHT e contagem de plaquetas, leucócitos ou HbF no grupo AF. Entretanto, os níveis de sLIGHT se correlacionaram positivamente com a contagem de leucócitos e a concentração de lactato desidrogenase no grupo AFHU (Tabela 3). Os níveis de sCD40L se correlacionaram apenas com o número de plaquetas no grupo AFHU e nenhuma outra correlação foi encontrada (Tabela 4). Em contraste, no grupo DFSC, foi encontrada uma correlação significativa entre a contagem de plaquetas e a concentração plasmática tanto de sLIGHT como de sCD40L (Tabelas 3 e 4, respectivamente).

Tabela 2. Dados demográficos e hematológicos dos pacientes com doença falciforme.

	AF	AFHU	DFSC
Masculino/Feminino	26/31	26/20	8/14
Idade	32.4 (31, 15, 59)	33.2 (30, 17, 58) P > 0.05	43 (43, 22, 65)
Hemácias (x10¹²L)	2.7 (2.8, 1.7, 4.3)	2.4 (2.3, 1.5, 3.6) P = 0.01	4.3 (4.2, 2.4, 6.3)
Hematócrito (%)	24.4 (23.8, 16.0, 34.9)	25.9 (25.9, 18.7, 36.4) P = 0.05	33.5 (32.7, 23.8, 47.4)
Hemoglobina (g/dL)	8.2 (7.9, 5.5, 11.8)	8.8 (8.7, 6.2, 11.7) P = 0.03	11.6 (11.3, 8.1, 15.7)
Volume corpuscular médio (fL)	89.9 (88.5, 71.1, 112.8)	107.5 (109.6, 73.1, 134.0) P < 0.0001	80.4 (76.7, 58.7, 113.9)
Hemoglobina corpuscular média (pg)	30.1 (30.3, 22.5, 35.9)	36.2 (36.8, 24.1, 44.8) P < 0.0001	28.2 (27.3, 18.2, 42.1)
Leucócitos (x10⁹L)	11.8 (11.0, 6.1, 29.6)	9.3 (9.1, 3.8, 15.0) P = 0.002	9.2 (8.4, 3.9, 15.3)
Plaquetas (x10⁹L)	383.7 (365, 163, 698)	350.6 (327, 108, 780) P > 0.05	306.7 (252, 88, 625)
HbF (%)	6.0 (5.8, 0.4, 21.5)	11.4 (11.1, 1.1, 29.3) P < 0.0001	1.1 (1.8, 0.3, 12.2)

Com exceção de sexo, todos os dados estão representados como média (mediana, mínimo, máximo) para pacientes com anemia falciforme (AF), pacientes com anemia falciforme em terapia com HU (AFHU) e pacientes com doença falciforme SC (DFSC). Os valores de P são referentes às comparações entre os grupos AF e AFHU. HbF, hemoglobina fetal.

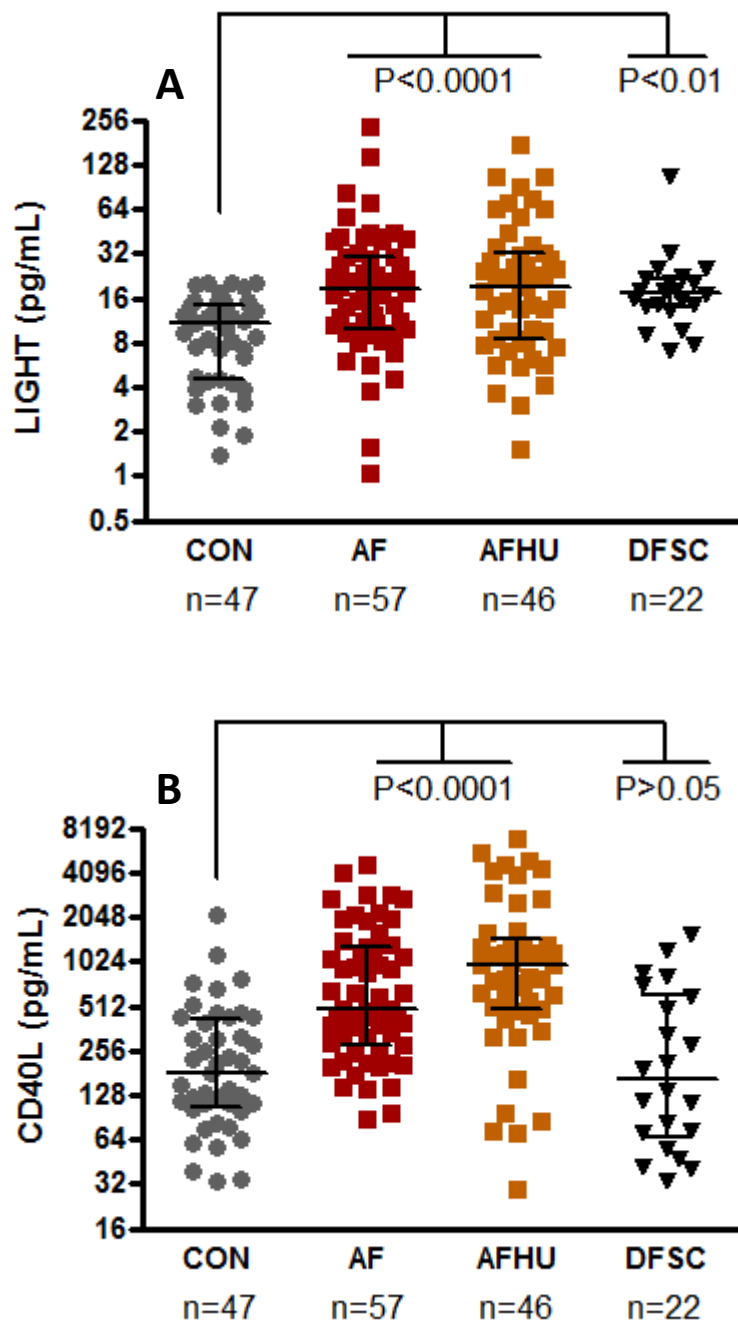


Figura 1. A concentração plasmática de sLIGHT (A) e sCD40L (B) foi determinada por ELISA de alta sensibilidade em indivíduos controle (CON), pacientes com anemia falciforme (AF), pacientes com anemia falciforme em terapia com HU (AFHU) e pacientes com doença falciforme SC (DFSC). Teste de *Kruskal Wallis*.

Tabela 3. Correlação dos níveis plasmáticos de sLIGHT com parâmetros hematológicos e laboratorial.

	Leucócitos 10 ⁹ /L	Plaquetas 10 ⁹ /L	Hemácias 10 ⁹ /L	Hemoglobina g/dL	Hematócrito (%)	Reticulócitos (%)	HbF (%)	LDH (U/L)
AF n = 57	r ^s =0.210 P= 0.117	r ^s = -0.036 P= 0.709	r ^s = 0.096 P= 0.480	r ^s = -0.0003 P= 0.998	r ^s =0.017 P= 0.903	r ^s = 0.134 P= 0.321	r ^s = 0.153 P= 0.309 (n = 46)	r ^s = 0.145 P= 0.290 (n = 55)
AFHU n = 46	r ^s =0.377 <u>P= 0.01</u>	r ^s = 0.161 P= 0.284	r ^s = 0.014 P= 0.927	r ^s = 0.015 P= 0.920	r ^s = 0.012 P= 0.935	r ^s = 0.245 P= 0.102	r ^s = -0.236 P= 0.143 (n = 40)	r ^s = 0.354 <u>P= 0.022</u> (n = 42)
AF+AFHU n = 103	r ^s = 0.284 <u>P< 0.004</u>	r ^s = 0.062 P= 0.534	r ^s = 0.061 P= 0.540	r ^s = -0.035 P= 0.727	r ^s = -0.018 P= 0.858	r ^s = 0.170 P= 0.086	r ^s = -0.102 P= 0.350 (n = 46)	r ^s = 0.260 <u>P= 0.01</u> (n = 55)
DFSC n = 22	r ^s = 0.210 P= 0.349	r ^s = 0.591 <u>P= 0.004</u>	r ^s = 0.047 P= 0.840	r ^s = 0.018 P= 0.936	r ^s = 0.003 P= 0.990	r ^s = -0.342 P= 0.119	r ^s = 0.111 P= 0.064 (n = 40)	N/D

As correlações foram calculadas usando o teste de *Spearman* e os valores de P< 0.05 estão sublinhados. HbF, hemoglobina fetal; LDH, lactato desidrogenase; N/D, não determinado.

Tabela 4. Correlação dos níveis plasmáticos de sCD40L com parâmetros hematológicos e laboratorial.

	Leucócitos 10 ⁹ /L	Plaquetas 10 ⁹ /L	Hemácias 10 ⁹ /L	Hemoglobina g/dL	Hematócrito (%)	Reticulócitos (%)	HbF (%)	LDH (U/L)
AF n = 57	r ^s = 0.109 P= 0.411	r ^s = 0.144 P= 0.276	r ^s = -0.049 P= 0.707	r ^s = -0.067 P= 0.615	r ^s = -0.054 P= 0.683	r ^s = 0.087 P= 0.510	r ^s = -0.095 P= 0.522 (n = 46)	r ^s = -0.160 P= 0.397 (n = 55)
AFHU n = 46	r ^s = 0.187 P= 0.199	r ^s = 0.425 <u>P= 0.002</u>	r ^s = 0.036 P= 0.807	r ^s = 0.152 P= 0.299	r ^s = 0.092 P= 0.528	r ^s = 0.096 P= 0.510	r ^s = 0.041 P= 0.795 (n = 40)	r ^s = -0.006 P= 0.973 (n = 42)
AF+AFHU n = 103	r ^s = 0.091 P= 0.349	r ^s = 0.235 <u>P= 0.014</u>	r ^s = -0.081 P= 0.405	r ^s = -0.052 P= 0.592	r ^s = 0.036 P= 0.712	r ^s = 0.085 P= 0.382	r ^s = 0.061 P= 0.565 (n = 46)	r ^s = -0.095 P= 0.466 (n = 55)
DFSC n = 22	r ^s = 0.115 P= 0.612	r ^s = 0.616 <u>P= 0.002</u>	r ^s = -0.377 P= 0.084	r ^s = -0.124 P= 0.582	r ^s = -0.172 P= 0.443	r ^s = 0.031 P= 0.891	r ^s = 0.195 P= 0.411 (n = 40)	N/D

As correlações foram calculadas usando o teste de *Spearman* e os valores de P < 0.05 estão sublinhados. HbF, hemoglobina fetal; LDH, lactato desidrogenase; N/D, não determinado.

6.2 Associação entre a elevada concentração plasmática de LIGHT e velocidade de regurgitação da tricúspide na anemia falciforme

Para investigar se LIGHT poderia ser um marcador de alguma complicação clínica, classificamos os pacientes com anemia falciforme em um grupo com elevados níveis plasmáticos de sLIGHT e outro grupo com baixo a moderado níveis de sLIGHT. O valor do *cut-off* utilizado para definir altas concentrações de sLIGHT foi de 30 pg/mL, correspondente ao valor de 75 percentil na população de pacientes estudada. Os dados clínicos foram coletados apenas dos pacientes do Hemocentro da UNICAMP (AF + AFHU; n = 47) e a presença ou ausência de manifestações clínicas foram comparadas nos dois grupos utilizando o teste exato de *Fisher*. Nenhuma associação foi observada entre altas concentrações de sLIGHT e AVC (acidente vascular cerebral, diagnosticado por ressonância magnética), osteonecrose (diagnosticado por radiografia), úlcera de perna, priapismo ou síndrome torácica aguda (diagnosticada por radiografia e outros sintomas específicos). Entretanto, uma associação significativa foi encontrada com uma população de pacientes que apresentavam elevada velocidade de regurgitação da tricúspide ($VRT \geq 2.5$ m/s). Velocidades acima de 2.5 m/s são consideradas um indicativo de hipertensão pulmonar em pacientes com anemia falciforme (Hassel, 2011). Os dados estão representados na Tabela 5. Nenhuma associação foi encontrada entre sCD40L e alguma manifestação clínica.

Tabela 5. Associação de sLIGHT com manifestações clínicas na anemia falciforme.

Complicação clínica	Plasma LIGHT <30.0 pg/mL n = 30	Plasma LIGHT >30.0 pg/mL n = 17	P-value Fisher's Exact
AVC	10.0%	5.8%	P = 1.000
Osteonecrose	10.0%	23.5%	P = 0.235
Úlcera de perna	10.0%	17.6%	P = 0.653
Priapismo	30.0% (n=10)	0.0% (n=07)	P = 0.228
Síndrome Torácica Aguda	20.0%	11.8%	P = 0.692
VRT ≥ 2.5 m/s	3.8% (n=26)	40.0% (n=15)	<u>P = 0.006</u>

AVC, Acidente Vascular Cerebral; VRT, Velocidade da regurgitação tricúspide

6.3 Correlação entre os níveis plasmáticos de LIGHT, CD40L, proteínas inflamatórias e marcadores de vasculopatia na anemia falciforme

Os níveis plasmáticos de sLIGHT, nos grupos AF e AFHU, apresentaram uma correlação expressiva com os níveis de CD40L. Observou-se também uma correlação significativa entre os níveis de sLIGHT e IL-8, um potente mediador inflamatório derivado do endotélio entre outras células. No entanto, apenas no grupo AF observou-se uma correlação positiva entre a concentração de sLIGHT e sICAM-1, enquanto que nenhuma correlação foi encontrada com os níveis de sVCAM-1 (Tabela 6). Embora seja descrito na literatura que o CD40L é capaz de induzir a produção de mediadores inflamatórios e moléculas de adesão em leucócitos e células endoteliais, nenhuma correlação foi encontrada com os níveis plasmáticos de IL-8, sICAM-1 ou sVCAM-1, todos marcadores de ativação endotelial (Tabela 7).

Tabela 6. Correlação dos níveis plasmático de sLIGHT com outras citocinas inflamatórias e marcadores de vasculopatia nos grupos de pacientes e controles.

	sCD40L	IL-8	sICAM-1	sVCAM-1
CON	$r^s=0.214$ $P>0.05$ n=40	$r^s= -0.500$ $P>0.05$ n=12	$r^s= -0.280$ $P>0.05$ n=20	$r^s=0.241$ $P>0.05$ n=10
AF	$r^s= 0.629$ $P<0.0001$ n=57	$r^s= 0.611$ $P=0.02$ n=15	$r^s=0.377$ $P=0.04$ n=31	$r^s=0.042$ $P>0.05$ n=18
AFHU	$r^s=0.601$ $P<0.0001$ n=43	$r^s=0.682$ $P=0.005$ n=15	$r^s=0.049$ $P>0.05$ n=23	$r^s=0.126$ $P>0.05$ n=12
DFSC	$r^s=0.425$ $P=0.048$ n=22	N/D	N/D	N/D

Os níveis de LIGHT no plasma de controles e pacientes foram correlacionados com CD40L, IL-8, sICAM-1 e sVCAM-1. N/D, não determinado. Teste de *Spearman*.

Tabela 7. Correlação dos níveis plasmático de sCD40L com outras citocinas inflamatórias e marcadores de vasculopatia nos grupos de pacientes e controles.

	sLIGHT	IL-8	sICAM-1	sVCAM-1
CON	$r^s=0.214$ $P>0.05$ n=40	$r^s= -0.383$ $P>0.05$ n=09	$r^s= -0.217$ $P>0.05$ n=19	$r^s= -0.122$ $P>0.05$ n=10
AF	$r^s= 0.629$ $P<0.0001$ n=57	$r^s= 0.214$ $P>0.05$ n=15	$r^s= -0.279$ $P>0.05$ n=32	$r^s= -0.211$ $P>0.05$ n=18
AFHU	$r^s=0.601$ $P<0.0001$ n=43	$r^s=0.512$ $P=0.06$ n=15	$r^s= -0.051$ $P>0.05$ n=23	$r^s=0.112$ $P>0.05$ n=21
DFSC	$r^s=0.425$ $P=0.048$ n=22	N/D	N/D	N/D

Os níveis de CD40L no plasma de controles e pacientes foram correlacionados com LIGHT, IL-8, sICAM-1 e sVCAM-1. Teste de *Spearman*.

6.4 Expressão de LIGHT na superfície de plaquetas e correlação com a ativação plaquetária.

O método de citometria de fluxo foi utilizado para avaliar a expressão proteica de LIGHT na superfície de plaquetas de controles e pacientes. Observou-se que a expressão de LIGHT estava significativamente maior na superfície das plaquetas de pacientes AF e AFHU em comparação com plaquetas de indivíduos controle (Fig. 2). Notavelmente, quando as plaquetas foram ativadas com ADP, essas células apresentaram uma expressão de LIGHT ainda maior nos grupos AF e AFHU do que no grupo CON (Fig. 2). A expressão de LIGHT tanto em plaquetas ativadas ou não com ADP se correlacionou significativamente com a expressão da integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$ ativada (Fig. 3), enquanto que a expressão de LIGHT se correlacionou com a expressão de P-selectina (Fig. 4), outro marcador de ativação plaquetária, apenas em plaquetas ativadas do grupo AF.

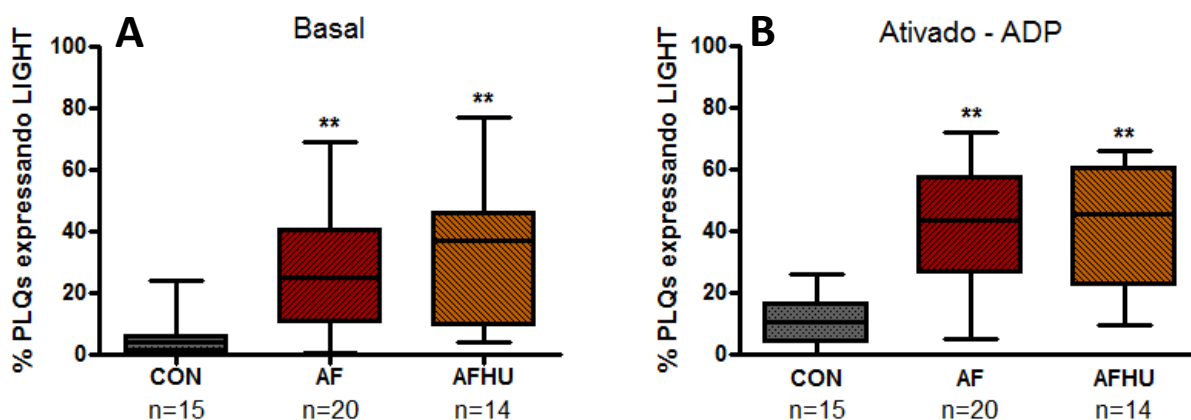


Figura 2. Porcentagem de plaquetas positivas para a proteína LIGHT em indivíduos controle (CON), pacientes com anemia falciforme (AF) e pacientes com anemia falciforme em terapia com HU (AFHU), em condição basal e após ativação das plaquetas com ADP (20 μ M). Teste de *Kruskal Wallis*, ** P<0.01 comparado ao controle.

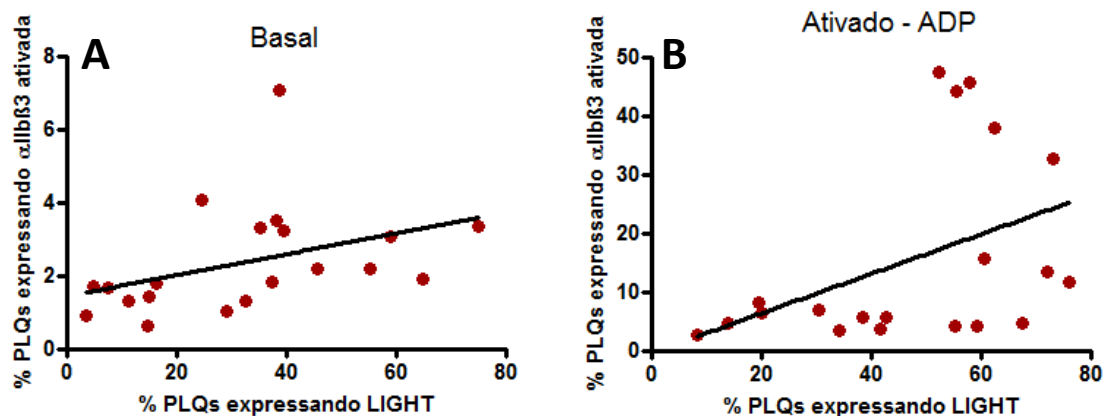


Figura 3. Correlação entre a expressão de LIGHT e a integrina $\alpha\text{IIb}\beta_3$ na sua conformação ativada na superfície das plaquetas de pacientes AF em condição basal (A; $R=0.649$, $P=0.002$) e após ativação dessas células com ADP (B; $R=0.483$, $P=0.03$). Teste de *Spearman*.

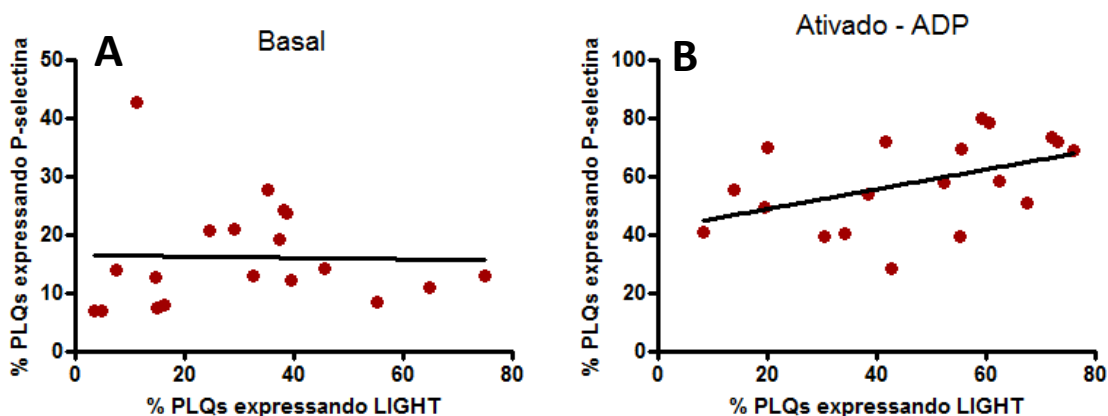


Figura 4. Correlação entre a expressão de LIGHT e P-selectina na superfície das plaquetas de pacientes AF em condição basal (A; $R=0.188$, $P > 0.05$) e após ativação dessas células com ADP (B; $R=0.502$, $P=0.03$). Teste de *Spearman*.

6.5 Expressão de CD40L na superfície de plaquetas de pacientes com anemia falciforme e indivíduos controles

Henn e colaboradores descreveram que plaquetas ativadas expressam CD40L em sua superfície (Henn *et. al.*, 1998). No entanto, na nossa população, menos de cinco por cento das plaquetas eram positivas para CD40L, não havendo diferença estatística entre os grupos (Fig. 5).

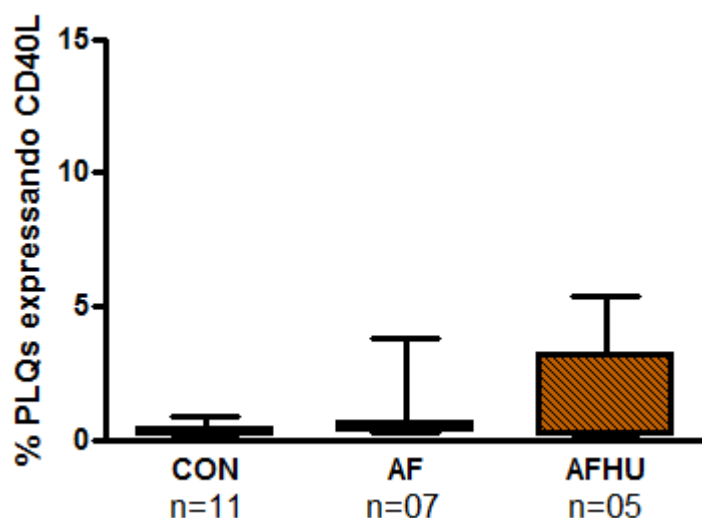


Figura 5. Porcentagem de plaquetas positivas para a proteína CD40L em indivíduos controle (CON), pacientes com anemia falciforme (AF) e pacientes com anemia falciforme em terapia com HU (AFHU). Teste de *Kruskall Wallis*, $P > 0.05$ comparado ao controle.

6.6 Secreção de sLIGHT e sCD40L por plaquetas de pacientes com anemia falciforme e indivíduos controle

Plaquetas lavadas de indivíduos controles e pacientes com anemia falciforme foram estimuladas ou não com ADP ou colágeno durante 90 minutos e a secreção de sLIGHT foi quantificada por ELISA. Concentrações significativas de sLIGHT puderam ser detectadas no sobrenadante de plaquetas dos grupos CON e AF, indicando que essas células podem ser uma importante fonte desta citocina na circulação (Fig. 6). A secreção de sCD40L também foi determinada por ELISA nas mesmas condições descritas a cima e foi observado que plaquetas de pacientes com anemia falciforme liberaram uma quantidade significativamente maior de sCD40L em comparação ao grupo controle (Fig. 7). A secreção de sLIGHT e sCD40L foi significativamente aumentada pela incubação das plaquetas com colágeno, mas não ADP (Figs. 6 e 7, respectivamente), indicando que o colágeno pode ser um ativador importante da liberação de sLIGHT e sCD40L na anemia falciforme.

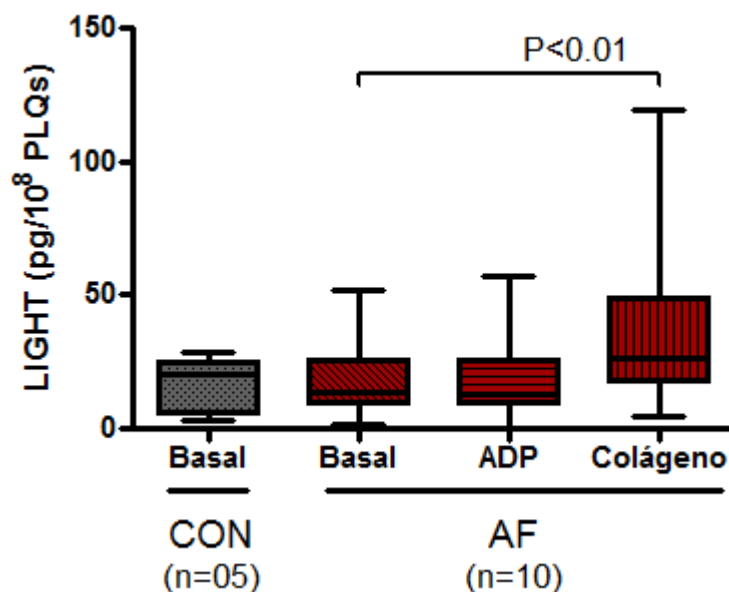


Figura 6. Plaquetas lavadas de controles e pacientes AF foram estimuladas ou não com ADP (20 μ M) ou colágeno (10 μ g/mL) durante 90 minutos. A concentração de sLIGHT presente no sobrenadante foi determinada por ELISA. Teste de Wilcoxon.

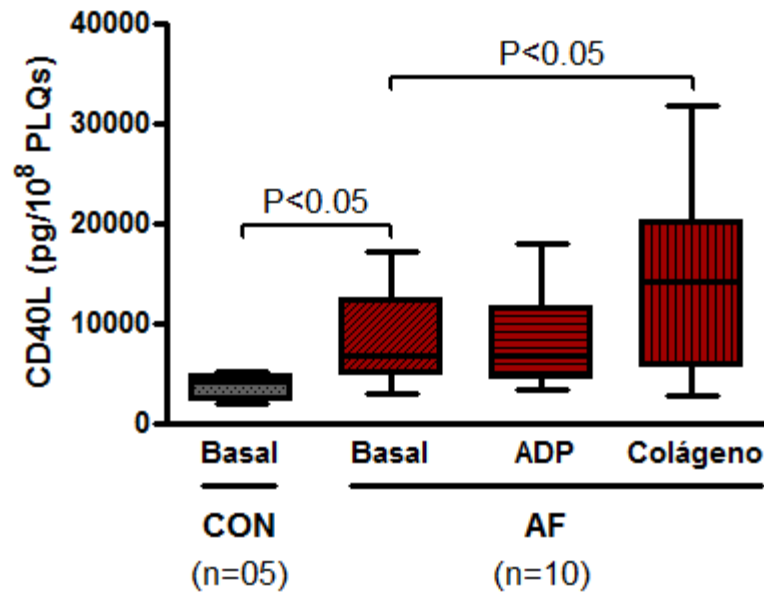


Figura 7. Plaquetas lavadas de controles e pacientes AF foram estimuladas ou não com ADP (20 μ M) ou colágeno (10 μ g/mL) durante 90 minutos. A concentração de sCD40L presente no sobrenadante foi determinada por ELISA. Teste de Mann Whitney e teste de Wilcoxon, respectivamente.

6.7 Correlação entre a secreção de sLIGHT e sCD40L em plaquetas de pacientes com anemia falciforme

Interessantemente foi observada uma correlação significativa entre os níveis de LIGHT e CD40L secretados por plaquetas de pacientes AF tanto em condição basal como após ativação das plaquetas com colágeno (Fig. 8). Nenhuma correlação foi encontrada entre os níveis de LIGHT e CD40L no sobrenadante de plaquetas ativadas com ADP. Resultados indicam que as liberações de LIGHT e CD40L por plaquetas parecem estar associadas.

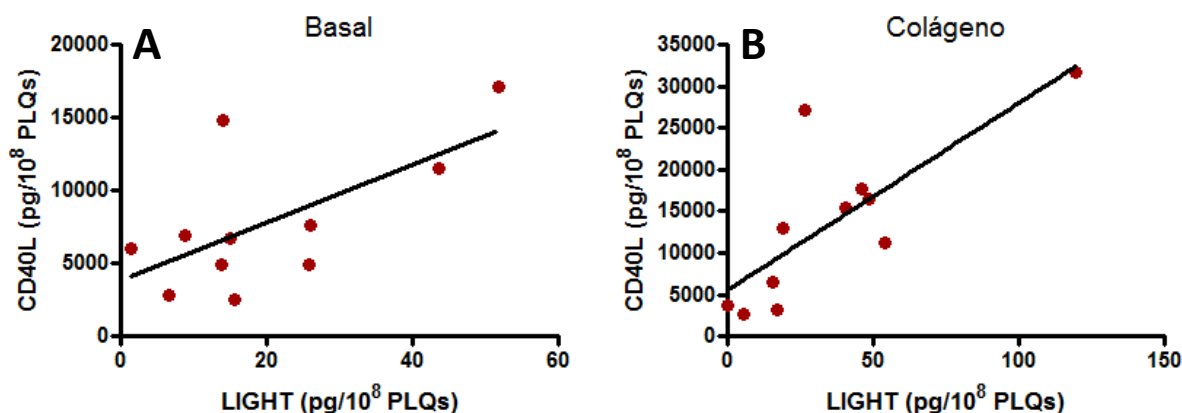


Figura 8. Correlação entre a secreção de sLIGHT e sCD40L por plaquetas de pacientes AF em condição basal (A; $R=0.654$, $P=0.03$) e após ativação dessas células com colágeno (B; $R=0.775$, $P=0.005$). Teste de *Spearman*.

6.8 Avaliação dos níveis plasmáticos do receptor DcR3 em pacientes com anemia falciforme e indivíduos controle

Decoy receptor 3 (DcR3) é um receptor solúvel pertencente à família do fator de necrose tumoral capaz de neutralizar os efeitos biológicos de LIGHT. Os níveis plasmáticos desse receptor foram determinados pelo método de ELISA em controles e pacientes com anemia falciforme. A concentração de DcR3 foi encontrada significativamente elevada no plasma de pacientes com anemia falciforme em terapia com hidroxiureia quando comparada com o grupo controle (Fig. 9).

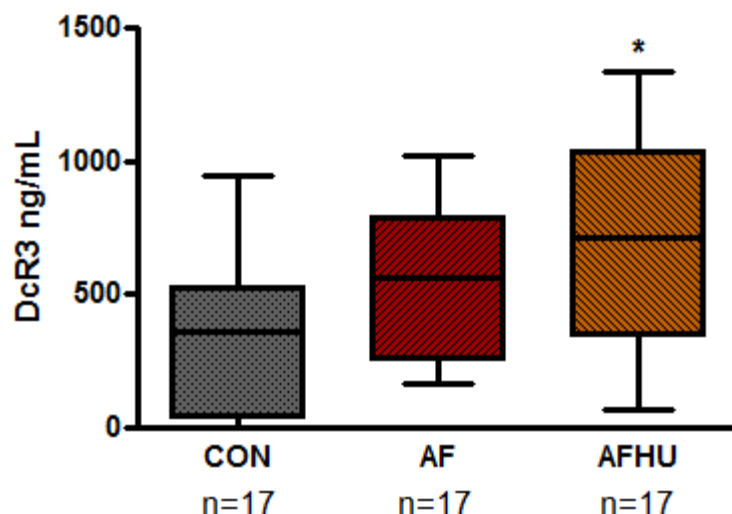


Figura 9. Concentração de DcR3 no plasma de indivíduos controle (CON), pacientes com anemia falciforme (AF) e pacientes com anemia falciforme em tratamento com hidroxiureia (AFHU). Teste de *Kruskal Wallis*, * $P < 0.05$ comparado ao controle.

6.9 Avaliação da expressão dos receptores HVEM, $LT\beta R$, e CD40 na superfície de plaquetas de pacientes com anemia falciforme e indivíduos controle

A expressão dos receptores de LIGHT (HVEM e $LT\beta R$) e CD40L (CD40) foi avaliada pelo método de citometria de fluxo em plaquetas de pacientes e controles. Esta análise foi feita em condição basal e após estímulo das plaquetas com ADP (20 μM). Para determinar a eficácia da ativação das plaquetas pelo ADP, foi analisada a expressão dos marcadores de ativação plaquetária P-selectina e glicoproteína $\alpha IIb\beta 3$ na sua conformação ativada (dados não mostrados). Foi observado que uma pequena porcentagem das plaquetas expressava os receptores HVEM e $LT\beta R$ em sua membrana. O grupo AF apresentou um aumento da expressão de HVEM na superfície das plaquetas quando comparado ao grupo controle (Fig. 10 A), enquanto que pacientes AFHU mostraram um aumento de $LT\beta R$ apenas após estímulo de ADP (Fig. 10 B). Observou-se também que uma grande quantidade de plaquetas expressava o receptor CD40, sendo que essa expressão estava maior no grupo AFHU em relação ao grupo controle (Fig. 10 C). Houve um discreto aumento na expressão dos receptores HVEM, $LT\beta R$ e CD40 na superfície das plaquetas de pacientes e controles após ativação com ADP, mas esse aumento não foi estatisticamente significativo.

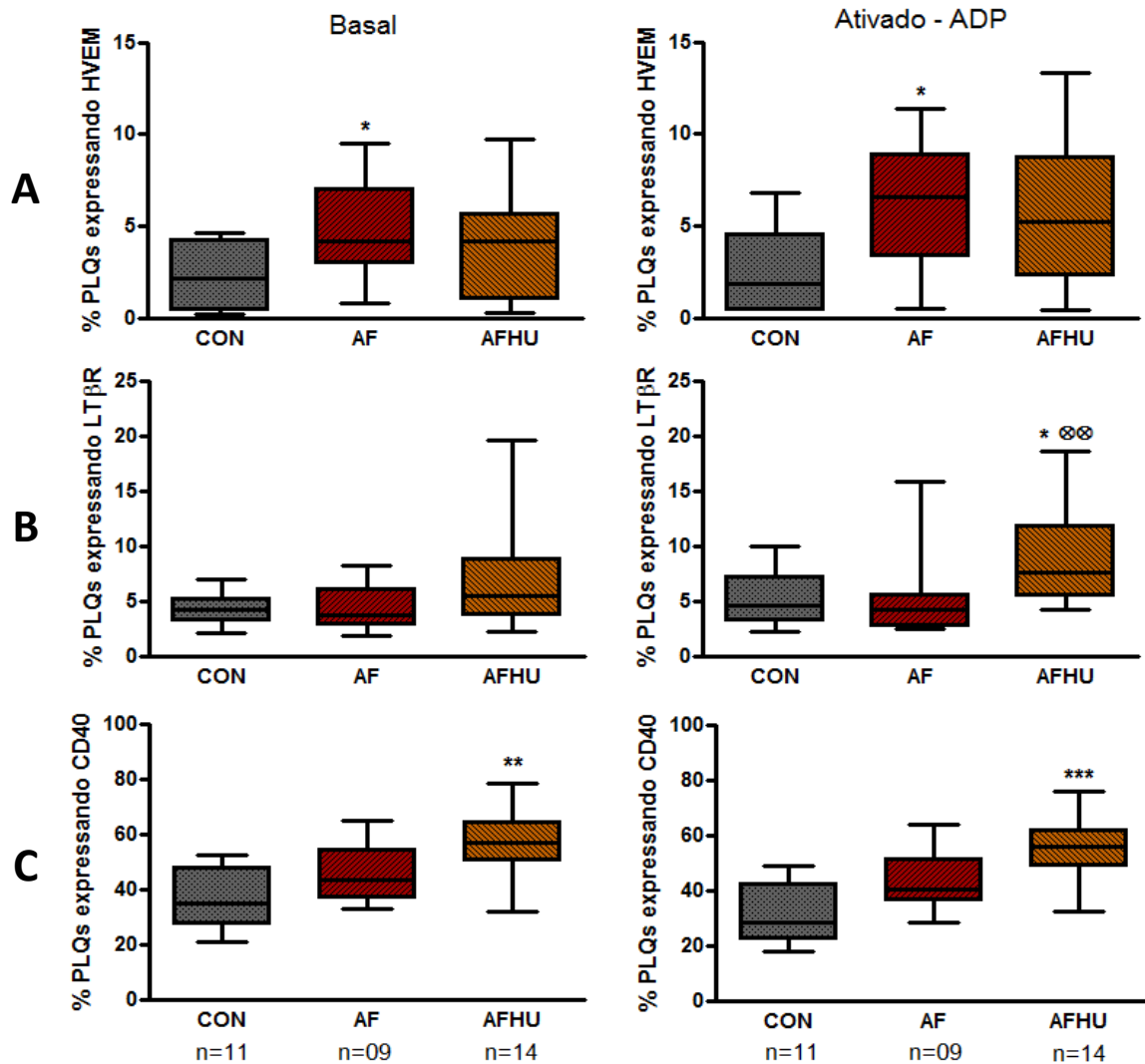


Figura 10. Expressão basal e após estímulo com ADP dos receptores HVEM (A), LTβR (B) e CD40 (C) na superfície de plaquetas de indivíduos controles (CON), pacientes com anemia falciforme (AF) e pacientes com anemia falciforme em tratamento com hidroxiureia (AFHU). Teste de *Kruskal Wallis*, ⊗ ⊗ P<0.01, comparado ao grupo AF; * P<0.05, ** P<0.01, *** P<0.001, comparado ao controle.

6.10 Avaliação da expressão gênica de LIGHT, HVEM, LT β R, CD40L e CD40 em neutrófilos

Como os leucócitos, em especial os neutrófilos, possuem um papel muito importante no processo vaso-oclusivo, resolvemos investigar se LIGHT e CD40L poderiam estar contribuindo para a ativação dessas células na anemia falciforme. Para isso, primeiramente foi avaliado se os neutrófilos de indivíduos controle e de pacientes com anemia falciforme expressavam os receptores de LIGHT e CD40L e também se esses neutrófilos poderiam estar contribuindo para a produção dessas duas proteínas. Dessa forma, o RNA de neutrófilos foi extraído e a expressão gênica de LIGHT, HVEM, LT β R, CD40L e CD40 foi determinada por PCR em tempo real. Não foram observadas diferenças significativas na expressão de LIGHT, LT β R ou CD40L entre os grupos de pacientes e controles (Fig. 11 A, C e D, respectivamente). A expressão gênica de HVEM apresentou-se elevada nos neutrófilos do grupo AF em relação ao grupo controle (Fig. 11 B), enquanto que observou-se uma maior expressão (estatisticamente significativa) de CD40 nos neutrófilos de pacientes AFHU (Fig. 11 E).

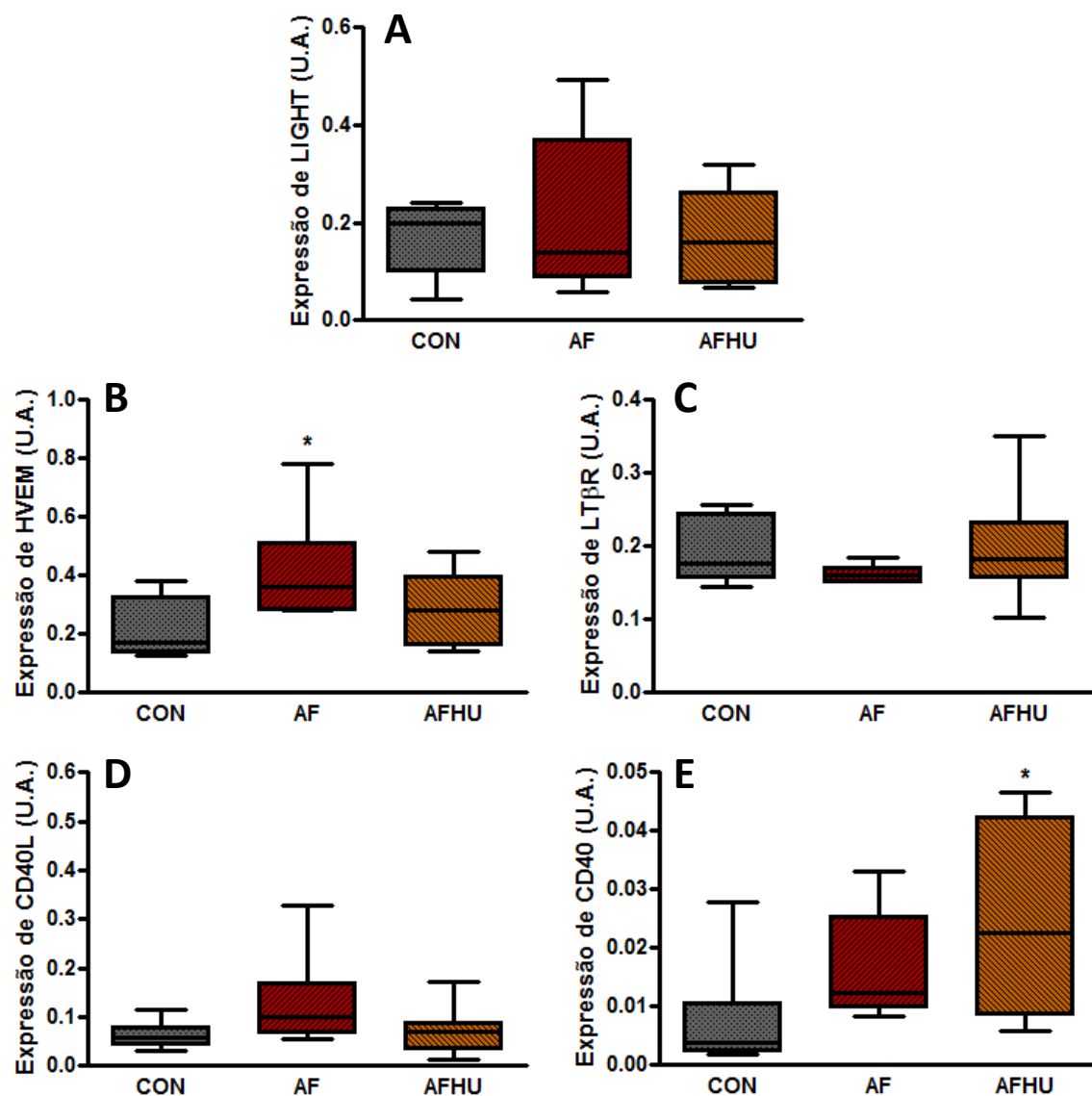


Figura 11. Expressão gênica de LIGHT (A), HVEM (B; Teste de Kruskal-Wallis, * $P < 0.05$), LTβR (C), CD40L (D) e CD40 (E; Teste de *Kruskal Wallis*, * $P < 0.05$) em neutrófilos de indivíduos controle (CON, n=5) e pacientes com anemia falciforme (AF, n=8; AFHU, n=11).

6.11 Avaliação da expressão proteica de LIGHT, HVEM, LT β R, CD40L e CD40 na superfície de neutrófilos

Para confirmar os resultados encontrados pela técnica de PCR quantitativo, a expressão de LIGHT, CD40L e seus receptores HVEM, LT β R e CD40 foi analisada por citometria de fluxo na superfície de neutrófilos de indivíduos controle e pacientes com anemia falciforme. Foi observado que os neutrófilos apresentavam uma expressão variada de LIGHT e HVEM (Fig. 12 A e B, respectivamente) em sua superfície, não havendo diferença na porcentagem de células positivas entre os grupos. Apenas uma pequena porcentagem dos neutrófilos de controles e pacientes expressaram LT β R em sua superfície, não havendo diferença significativa entre os grupos (Fig. 12 C). A expressão de CD40L foi praticamente inexistente (Fig. 12 D) na superfície dos neutrófilos, independentemente do grupo. Em contraste, os neutrófilos do grupo AFHU apresentaram uma expressão elevada do receptor CD40 em relação ao grupo controle (Fig. 12 E).

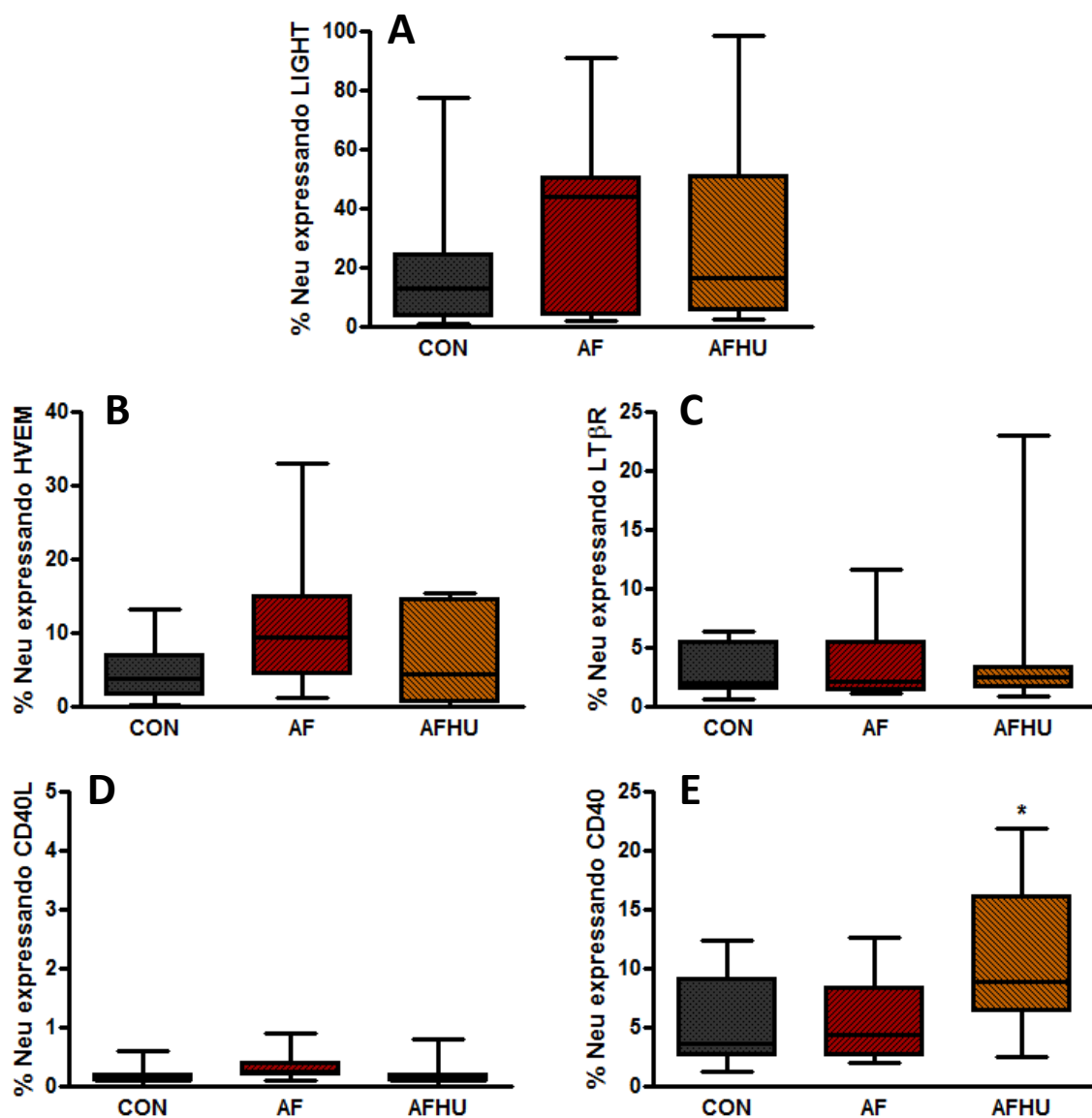


Figura 12. Porcentagem de neutrófilos que expressam LIGHT (A), HVEM (B), LTβR (C), CD40L (D) e CD40 (E) em pacientes com anemia falciforme (AF, n = 8), pacientes com anemia falciforme em terapia com hidroxiureia (AFHU, n = 15) e indivíduos controle (CON, n = 13). A expressão dessas moléculas foi avaliada pelo método de citometria de fluxo e a população de neutrófilos foi identificada utilizando gráficos “dot plot” SSC x FSC (*side scatter x forward scatter*). Teste de *Kruskall Wallis*, * P<0.05.

6.12 Avaliação da expressão gênica de LIGHT, HVEM, LT β R, CD40L e CD40 em células mononucleares

Considerando a importância dos leucócitos na fisiopatogenia da anemia falciforme, também foi avaliada se a produção de LIGHT e CD40L estaria alterada em células mononucleares de pacientes com anemia falciforme e se essas células expressavam os receptores destas duas citocinas. Dessa forma, após separação da camada de células mononucleares por gradiente de densidade, a expressão dos genes que codificam LIGHT, HVEM, LT β R, CD40L e CD40 foi determinada por PCR quantitativo em tempo real. Não houve diferença entre os grupos de pacientes e controles quanto a expressão dos genes que codificam LIGHT, HVEM, LT β R e CD40 (Fig. 13 A, B, C e E, respectivamente) nas células mononucleares. Entretanto, observou-se uma diminuição estatisticamente significativa na expressão do gene que codifica o CD40L nas células mononucleares do grupo AF quando comparado com o grupo controle (Fig. 13 D).

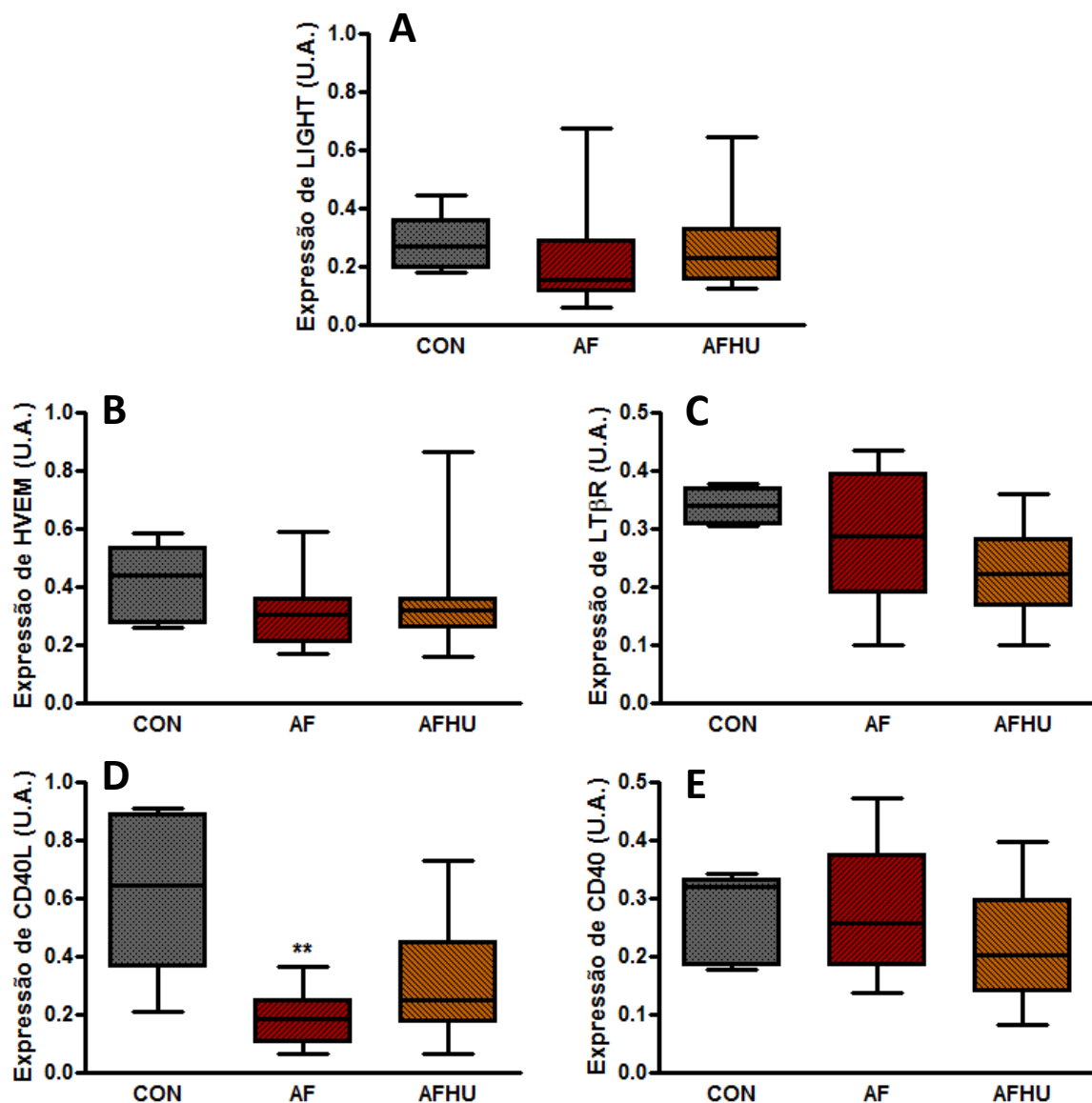


Figura 13. Expressão dos genes que codificam LIGHT (A), HVEM (B), LTβR (C), CD40L (D) e CD40 (E) em células mononucleares de indivíduos controles (CON, n = 6), pacientes com anemia falciforme (AF, n = 13) e pacientes com anemia falciforme em terapia com hidroxiureia (AFHU, n = 15). Teste de *Kruskal Wallis*, **P<0.01.

6.13 Avaliação da expressão das proteínas LIGHT, HVEM, LT β R, CD40L e CD40 na superfície de linfócitos e monócitos

Como a camada de células monocíticas é composta por uma grande quantidade de linfócitos e uma pequena parte de monócitos, e essa proporção varia muito entre os indivíduos controle e os pacientes, a expressão de LIGHT, HVEM, LT β R, CD40L e CD40 foi avaliada pelo método de citometria de fluxo em linfócitos e monócitos. Os linfócitos foram identificados por um *gate* para isolar as células CD3 positivas utilizando gráficos “*dot plot*” SSC (*side scatter*) x CD3. Uma porcentagem muito pequena de linfócitos expressaram LIGHT, LT β R e CD40L, tanto em pacientes quanto em controles (Fig. 14 A, C e D, respectivamente). Em contraste, foi observada uma expressão maior do receptor HVEM nos linfócitos em geral, sendo significativamente aumentada no grupo AFHU, quando comparado com o grupo controle (Fig. 14 B). Adicionalmente, a expressão de CD40 na superfície dos linfócitos estava elevada tanto nos pacientes AF quanto AFHU, em relação aos indivíduos controle (Fig. 14 E).

A população de monócitos foi identificada por um *gate* para analisar isoladamente as células CD14 positivas utilizando gráficos “*dot plot*” SSC x CD14. Com essa técnica, observou-se um discreto aumento na porcentagem de monócitos que expressam CD40 em pacientes AF e AFHU (Fig. 15 E), ficando significativo apenas quando esses pacientes foram considerados no mesmo grupo (Fig. 15 F). Uma grande variação na expressão de LIGHT e HVEM (Fig. 15 A e B) foi observada nos monócitos de pacientes e controles, não sendo observada grandes diferenças entre os grupos. As proteínas LT β R e CD40L (Fig. 15 C e D) foram detectadas apenas em uma pequena porcentagem dos monócitos, não havendo diferença estatística entre os grupos.

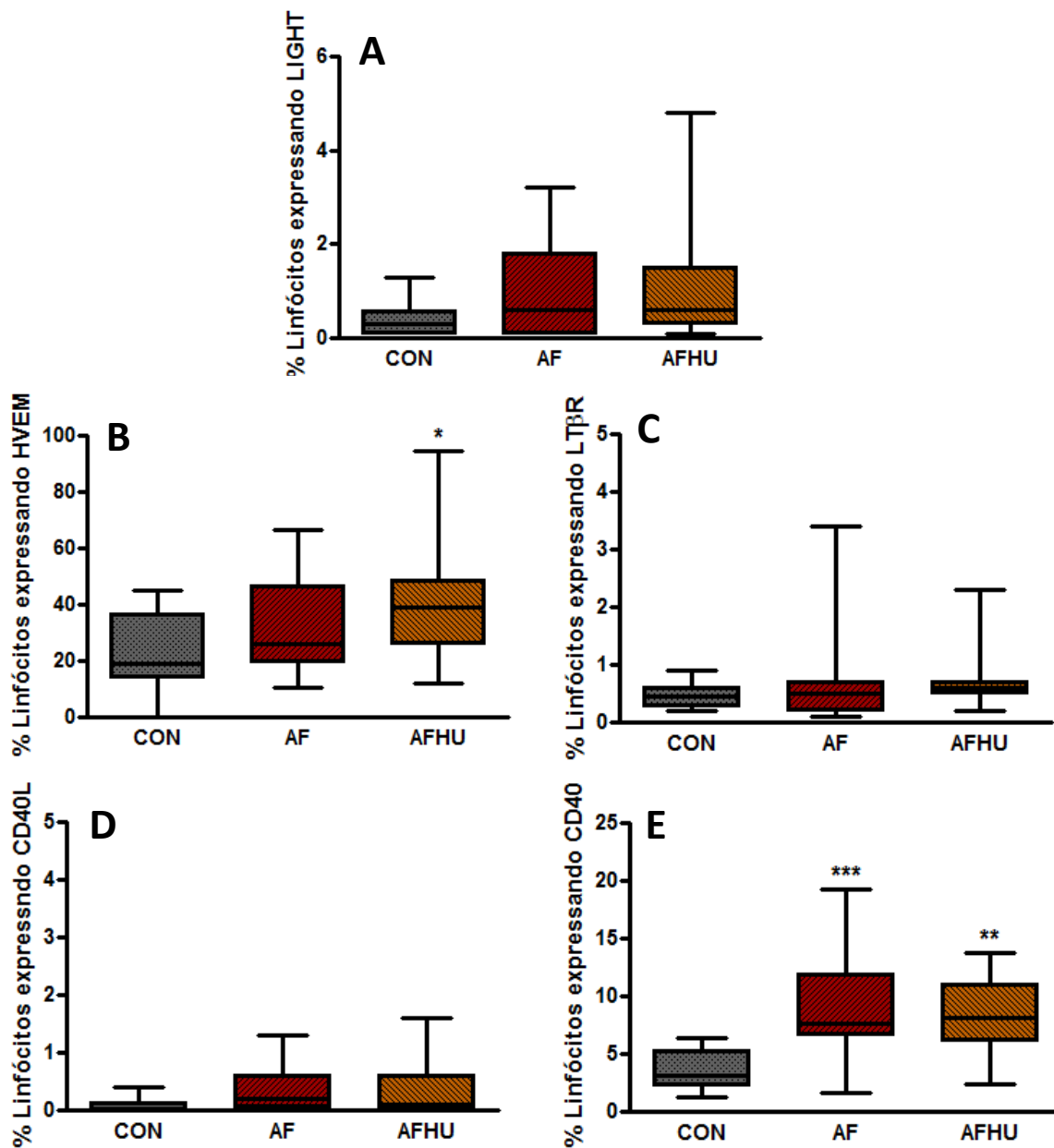


Figura 14. Porcentagem de linfócitos que expressam LIGHT (A), HVEM (B), LTβR (C), CD40L (D) e CD40 (E) em indivíduos controles (CON, n = 14), pacientes com anemia falciforme (AF, n = 9) e pacientes com anemia falciforme em terapia com hidroxiureia (AFHU, n = 16). A expressão dessas moléculas foi avaliada pelo método de citometria de fluxo e a população de linfócitos foi identificada utilizando gráficos “dot plot” SSC x CD3 (side scatter x CD3). Teste de *Kruskal Wallis*, * P<0.05, ** P<0.01, *** P<0.001, comparado ao grupo controle.

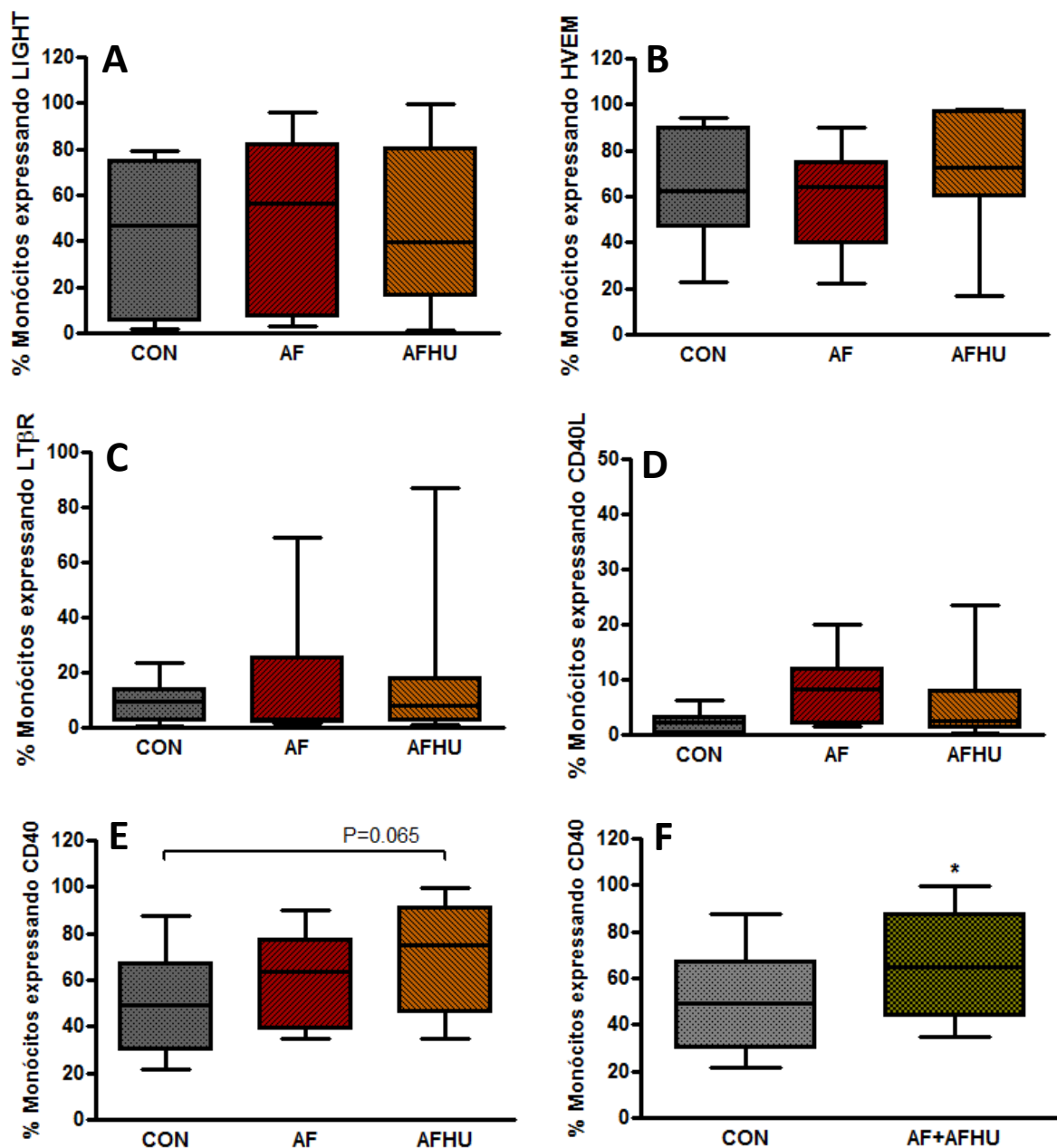


Figura 15. Porcentagem de monócitos que expressam LIGHT (A), HVEM (B), LT β R (C), CD40L (D) e CD40 (E e F) em indivíduos controles (CON; n = 14) e pacientes com anemia falciforme (AF, n = 9; AFHU, n = 16; AF + AFHU, n = 25). A expressão dessas moléculas foi avaliada pelo método de citometria de fluxo e a população de monócitos foi identificada utilizando gráficos “dot plot” SSC x CD14. Teste de *Kruskall Wallis* e teste de *Mann Whitney*, *P<0.05, comparado ao grupo controle.

6.14 Capacidade das plaquetas de ativar os neutrófilos

Sabe-se que alguns estímulos inflamatórios são capazes de aumentar a expressão de algumas integrinas, como as $\beta 2$ -integrinas LFA-1 (CD11a/CD18) e Mac-1 (CD11b/CD18), que estão envolvidas na adesão dos neutrófilos ao endotélio. Para avaliar a contribuição das plaquetas para a ativação dos neutrófilos, neutrófilos e plaquetas foram incubados por quinze minutos ou uma hora e a expressão das moléculas CD11a, CD11b e CD66b (marcador da ativação de granulócitos) foi avaliada por citometria de fluxo. Os anticorpos anti-CD11a e anti-CD11b utilizados neste experimento são capazes de reconhecer essas moléculas apenas quando elas estão na conformação de alta afinidade. Aproximadamente noventa e nove por cento dos neutrófilos expressam CD11a, CD11b e CD66b em sua superfície (resultados não mostrados), desta forma nós avaliamos a média de intensidade de fluorescência emitida pelos neutrófilos após marcação com os anticorpos de escolha. Com essa medida podemos analisar e comparar qualitativamente a expressão dessas moléculas em cada célula. Foi observado que a incubação de neutrófilos com as plaquetas, tanto de indivíduos controle como de pacientes com anemia falciforme, não foi capaz de aumentar a expressão das moléculas CD66b (Fig. 16) ou CD11a (Fig. 17) na superfície dos neutrófilos. Entretanto, as plaquetas do grupo CON induziram uma maior expressão da subunidade CD11b nos neutrófilos quando comparado aos neutrófilos em condição basal (Fig. 18). Seria importante aumentar o N experimental deste experimento para a confirmação dos achados.

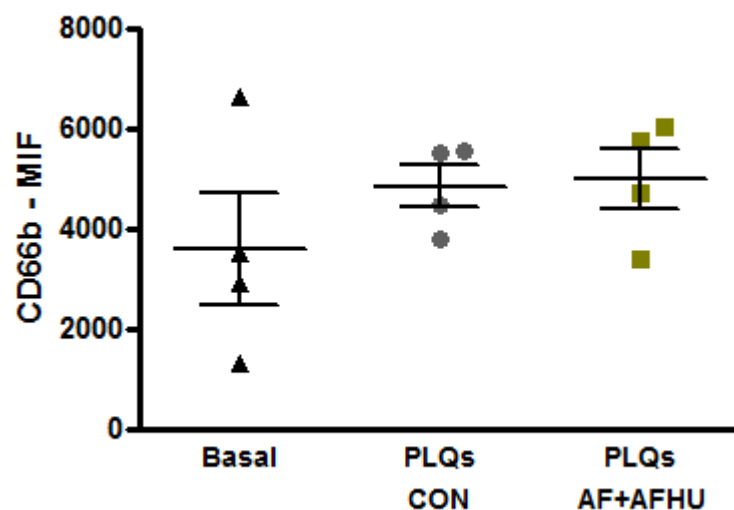


Figura 16. Expressão da molécula CD66b em neutrófilos controle em condição basal e após incubação com plaquetas de indivíduos controles (PLQs CON) e pacientes com anemia falciforme (PLQs AF+AFHU). Neutrófilos e plaquetas foram incubados por 1 hora e a expressão de CD66b foi avaliada por citometria de fluxo. Expressão relatada como Média de intensidade de fluorescência (MIF). $P > 0,05$; ANOVA (*Repeated measures*) seguido pelo teste de *Bonferroni*.

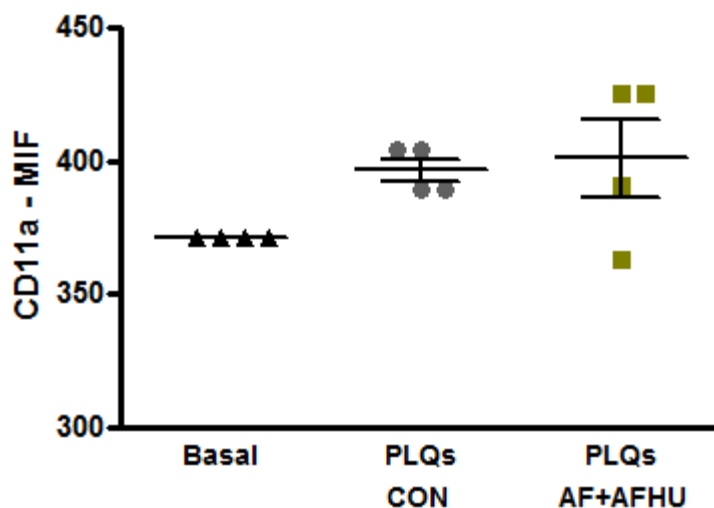


Figura 17. Expressão da integrina CD11a (subunidade da LFA-1) na sua conformação ativada em neutrófilos controle em condição basal e após incubação com plaquetas de indivíduos controles (PLQs CON) e pacientes com anemia falciforme (PLQs AF+AFHU). Neutrófilos e plaquetas foram incubados por 15 minutos e a expressão de CD11a foi avaliada por citometria de fluxo. Expressão relatada como Média de intensidade de fluorescência (MIF). $P > 0,05$; ANOVA (*Repeated measures*) seguido pelo teste de *Bonferroni*.

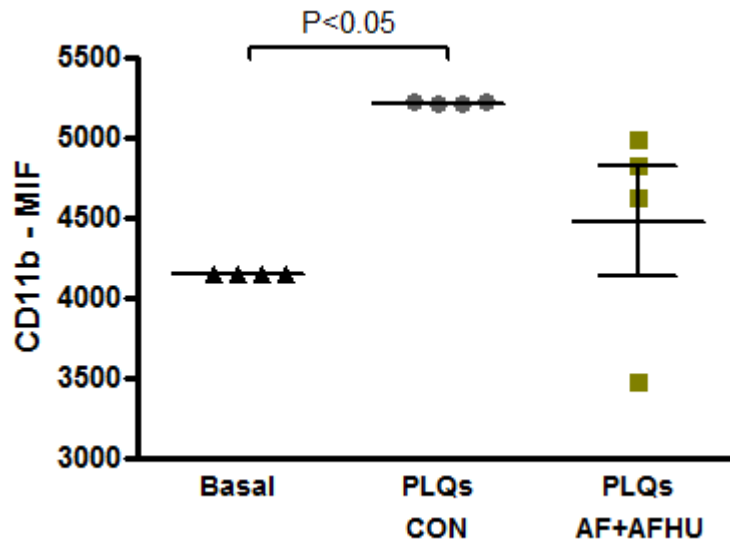


Figura 18. Expressão da integrina CD11b (subunidade da Mac-1) na sua conformação ativada em neutrófilos controle em condição basal e após incubação com plaquetas de indivíduos controles (PLQs CON) e pacientes com anemia falciforme (PLQs AF+AFHU). Neutrófilos e plaquetas foram incubados por 15 minutos e a expressão de CD11b foi avaliada por citometria de fluxo. Expressão relatada como Média de intensidade de fluorescência (MIF). $P > 0,05$; ANOVA (*Repeated measures*) seguido pelo teste de *Bonferroni*.

6.15 Capacidade das plaquetas de ativar os linfócitos

Após ativação dos linfócitos, uma das primeiras moléculas a ser expressa em sua superfície é o CD69, por este motivo essa molécula é considerada um marcador de ativação linfocitária (Ziegler *et. al.*, 1994). A expressão da molécula de adesão ICAM-1 também pode ser observada em linfócitos ativados e está relacionada com a interação entre os leucócitos (Altmann *et. al.*, 1989). A expressão dessas duas moléculas foi avaliada por citometria de fluxo em linfócitos isolados de indivíduos controle após incubação dessas células com plaquetas de indivíduos controle e pacientes com anemia falciforme. A identificação dos linfócitos foi baseada na expressão de CD3, utilizando gráficos “dot plot” SSC (*side scatter*) x CD3. Não houve alteração na expressão de ICAM-1 dos linfócitos na presença de plaquetas de controles e pacientes (Fig. 19). Notavelmente, as plaquetas de pacientes com anemia falciforme foram capazes de aumentar a expressão de CD69 nos linfócitos, quando comparada à expressão basal dessa molécula nos linfócitos controle (Fig. 20).

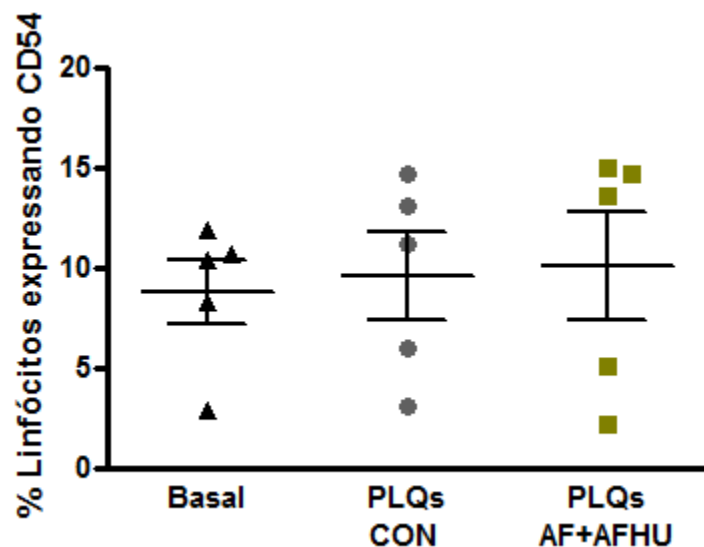


Figura 19. Porcentagem de linfócitos que expressam ICAM-1 (CD54) em condição basal e após incubação com plaquetas de indivíduos controles (PLQs CON) e plaquetas de pacientes com anemia falciforme (PLQs AF+AFHU). Linfócitos e plaquetas foram incubados por 1 hora e a expressão de ICAM-1 foi avaliada por citometria de fluxo. $P > 0,05$; ANOVA (*Repeated measures*) seguido pelo teste de *Bonferroni*.

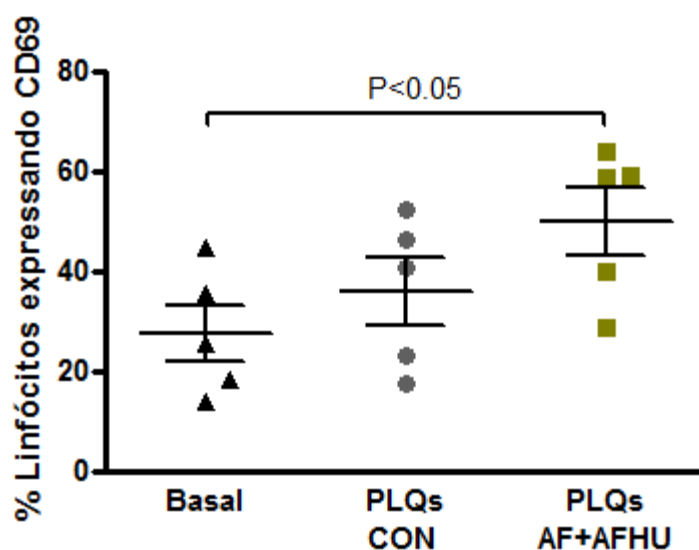


Figura 20. Porcentagem de linfócitos que expressam CD69 em condição basal e após incubação com plaquetas de indivíduos controles (PLQs CON) e plaquetas de pacientes com anemia falciforme (PLQs AF+AFHU). Linfócitos e plaquetas foram incubados por 1 hora e a expressão de CD69 foi avaliada por citometria de fluxo. ANOVA (*Repeated measures*) seguido pelo teste de *Bonferroni*.

6.16 Capacidade das plaquetas de ativação dos monócitos

Os monócitos são células bastante importantes do sistema imune e possuem um papel relevante na anemia falciforme. Essas células podem ser classificadas basicamente em dois subgrupos, os monócitos clássicos (CD14⁺ CD16⁻) e os monócitos pró-inflamatórios (CD14⁺ CD16⁺). Neste estudos nós avaliamos a presença de monócitos clássicos e pró-inflamatórios no sangue periférico de indivíduos controle e pacientes com anemia falciforme, assim como a capacidade das plaquetas de induzir o fenótipo pró-inflamatório em monócitos controle. Para isso, monócitos foram incubados com plaquetas de controles ou pacientes por uma hora a 37°C, posteriormente a expressão das moléculas CD14 e CD16 foi analisada por citometria de fluxo. Da mesma maneira, a expressão de CD11b (subunidade alfa da integrina Mac-1) e do fator tecidual também foi avaliada. A identificação dos monócitos foi baseada na expressão de CD14, utilizando gráficos “*dot plot*” SSC (*side scatter*) x CD14. Foi observado que pacientes com anemia falciforme em terapia com HU possuem uma porcentagem maior de monócitos pró-inflamatórios na corrente sanguínea quando comparados com indivíduos controle (Fig. 21). Interessantemente, apenas as plaquetas de pacientes com anemia falciforme foram capazes de induzir a expressão de CD16 em monócitos controle (Fig. 22). Em contraste, nenhuma alteração na expressão de CD11b ou fator tecidual foi encontrada nos monócitos após incubação com plaquetas tanto de controles como de pacientes (Figs. 23 e 24, respectivamente).

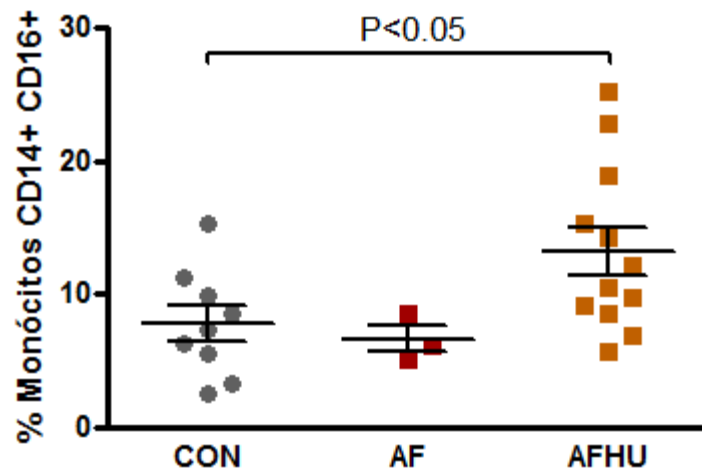


Figura 21. Porcentagem de monócitos positivos para as moléculas CD14 e CD16 (monócitos pró-inflamatórios) no sangue periférico de indivíduos controles (CON), pacientes com anemia falciforme (AF) e pacientes com anemia falciforme em terapia com HU (AFHU). Após separação das células mononucleares a expressão de CD14 e CD16 foi avaliada por citometria de fluxo. Teste de *Kruskal Wallis*.

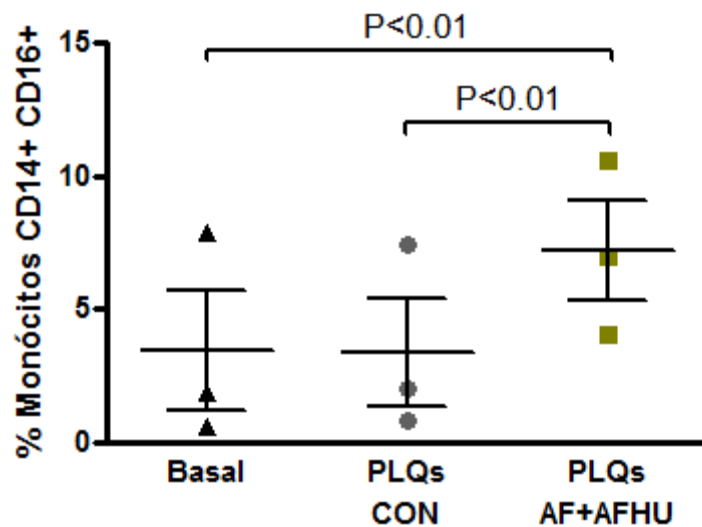


Figura 22. Efeito da incubação de plaquetas de controles (PLQs CON) e de pacientes com anemia falciforme (PLQs AF+AFHU) na expressão das moléculas CD14 e CD16 em monócitos isolados de indivíduos controle. Monócitos e plaquetas foram incubados por 1 hora e a expressão de CD14 e CD16 foi avaliada por citometria de fluxo. ANOVA (*Repeated measures*) seguido pelo teste de *Bonferroni*.

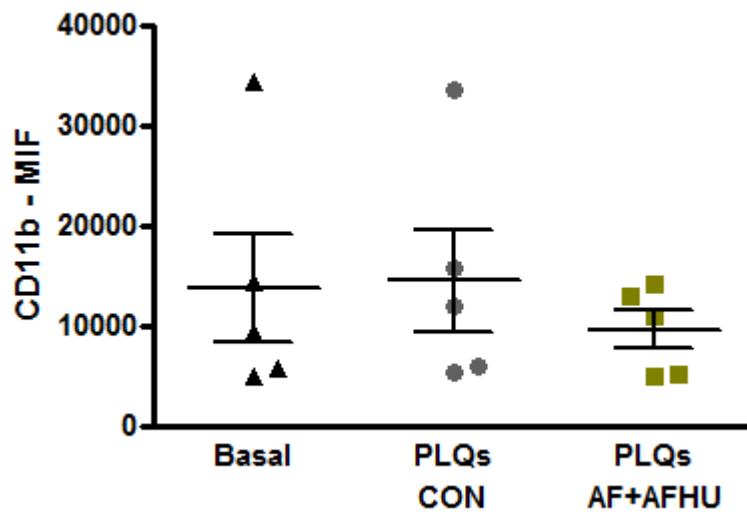


Figura 23. Expressão da integrina CD11b em monócitos isolados de indivíduos controle em condição basal e após incubação com plaquetas de controles (PLQs CON) e pacientes com anemia falciforme (PLQs AF+AFHU). Monócitos e plaquetas foram incubados por 1 hora e a expressão de CD11b foi avaliada por citometria de fluxo. Expressão relatada como Média de intensidade de fluorescência (MIF). $P>0,05$; ANOVA (*Repeated measures*) seguido pelo teste de *Bonferroni*.

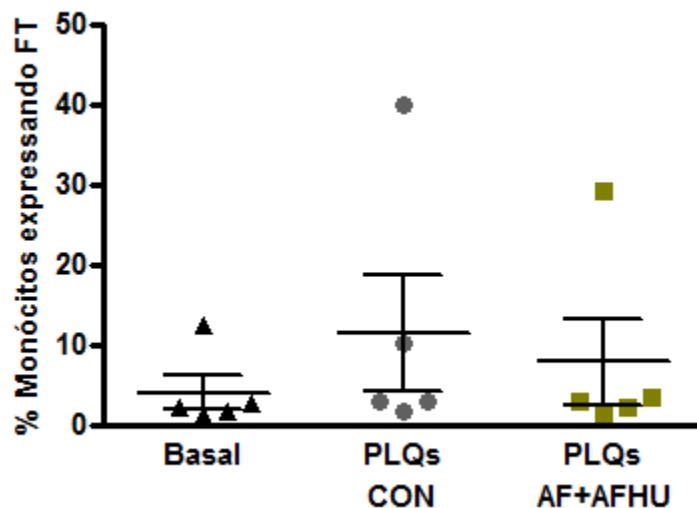


Figura 24. Porcentagem de monócitos que expressam fator tecidual (FT) em condição basal e após incubação com plaquetas de indivíduos controles (PLQs CON) e pacientes com anemia falciforme (PLQs AF+AFHU). Monócitos e plaquetas foram incubados por 1 hora e a expressão de FT foi avaliada por citometria de fluxo. $P>0,05$; ANOVA (*Repeated measures*) seguido pelo teste de *Bonferroni*.

6.17 Capacidade das plaquetas de ativação de células endoteliais

Para investigar a participação das plaquetas na ativação de células endoteliais, HUVECs foram incubadas com plaquetas por 24 horas e a expressão de moléculas de adesão endotelial foi avaliada por citometria de fluxo. Foi observado que um número muito pequeno de HUVECs expressavam VCAM-1 e E-selectina e o contato com as plaquetas, tanto de pacientes como de controles, não foi capaz de aumentar a expressão dessas moléculas sob essas condições (Fig. 25 A e B, respectivamente). Em condição basal aproximadamente trinta e cinco por cento das HUVECs expressam ICAM-1, sendo que a co-cultura dessas células com plaquetas por 24 horas provocou um aumento no número de células positivas para esta molécula, considerada um marcador de ativação endotelial (Fig. 26). Também foi observado que as plaquetas de pacientes com anemia falciforme induzem uma maior expressão de ICAM-1 em HUVECs do que as plaquetas de indivíduos controle (Fig. 26).

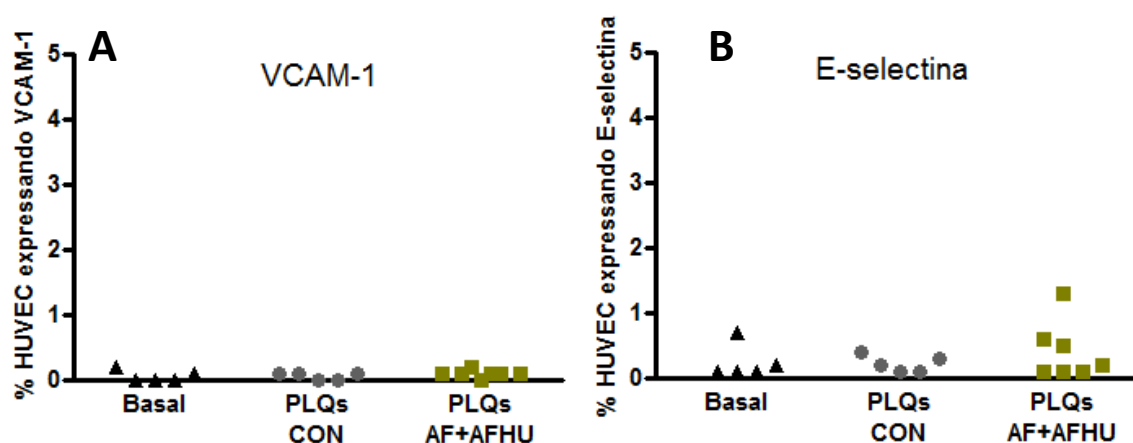


Figura 25. Porcentagem de HUVECs que expressam VCAM-1 (A) e E-selectina (B) em condição basal e após incubação com plaquetas de indivíduos controles (PLQs CON) e de pacientes com anemia falciforme (PLQs AF+AFHU). HUVECs foram cultivadas por 24 horas (37°C) na presença de plaquetas (3×10^8 PLQs/mL) e a expressão de E-selectina e VCAM-1 foi avaliada por citometria de fluxo.

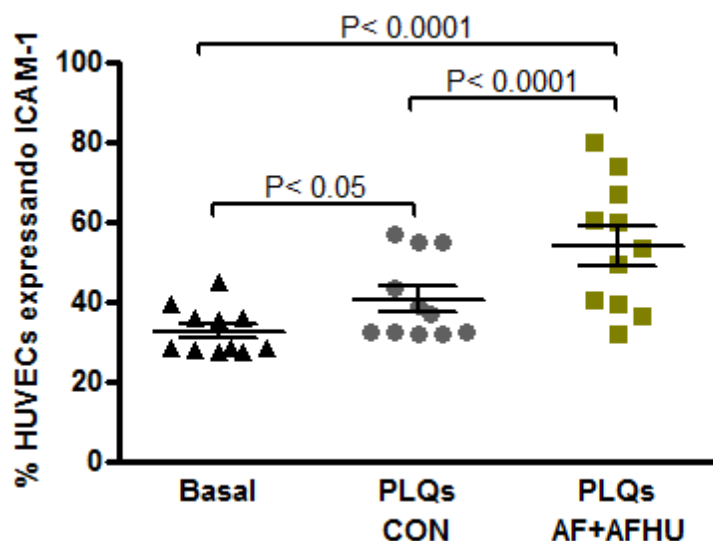


Figura 26. Porcentagem de HUVECs que expressam ICAM-1 em condição basal e após incubação com plaquetas de indivíduos controles (PLQs CON) e de pacientes com anemia falciforme (PLQs AF+AFHU). HUVECs foram cultivadas por 24 horas (37°C) na presença de plaquetas (3×10^8 PLQs/mL) e a expressão de ICAM-1 foi avaliada por citometria de fluxo. ANOVA (*Repeated measures*) seguido pelo teste de *Bonferroni*.

6.18 Avaliação do papel de LIGHT e CD40L na ativação mediada por plaquetas de células endoteliais

Para estudar a participação de LIGHT e CD40L na ativação mediada por plaquetas de células endoteliais, anticorpos inibidores dessas duas proteínas foram incubados com plaquetas antes de adicionar essas células sobre as HUVECs. A presença do anticorpo anti-CD40L aboliu drasticamente o aumento da expressão de ICAM-1 provocado pelas plaquetas de pacientes com anemia falciforme, enquanto que na presença do anticorpo anti-LIGHT nós observamos uma redução na expressão de ICAM-1 mas ela não foi estatisticamente significativa possivelmente pelo número pequeno de experimentos (Fig. 27).

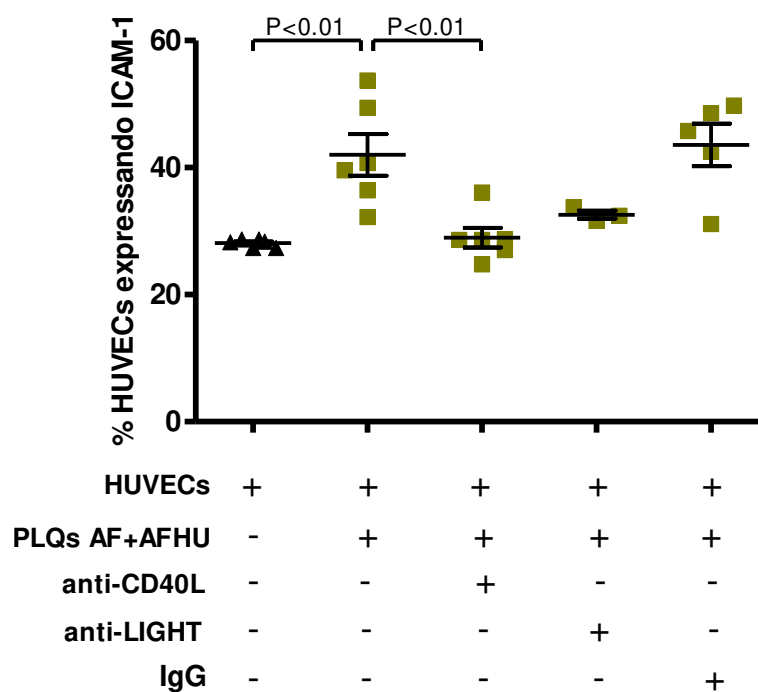


Figura 27. Expressão da molécula de adesão ICAM-1 nas HUVECs em condição basal, após incubação com plaquetas de pacientes com anemia falciforme e na presença ou ausência de anticorpos anti-LIGHT e anti-CD40L. HUVECs e plaquetas foram co-cultivadas por 24 horas (37°C) e a expressão de ICAM-1 foi avaliada por citometria de fluxo. ANOVA (*Repeated measures*) seguido pelo teste de *Bonferroni*.

6.19 Avaliação dos níveis plasmáticos de sLIGHT e sCD40L no coorte de pacientes com anemia falciforme de Londres – Reino Unido

Esses experimentos foram realizados durante um estágio de seis meses no King's College London, sob a supervisão da pesquisadora Dra. Swee Lay Thein. Este estágio teve apoio financeiro da FAPESP, através do programa de Bolsa Estágio de Pesquisa no Exterior (BEPE).

6.19.1 Dados hematológicos e níveis plasmáticos de sLIGHT e sCD40L em pacientes com anemia falciforme

O plasma de quarenta e um pacientes com anemia falciforme (AF), vinte e um pacientes com anemia falciforme em terapia com hidroxiureia (AFHU) e trinta indivíduos controle (CON) foi avaliado. As características demográficas e laboratoriais dos pacientes estão resumidas na Tabela 8. A concentração de sLIGHT e sCD40L foi quantificada no plasma de pacientes e controles também pelo método de ELISA. O grupo AF apresentou níveis elevados de sLIGHT, enquanto a concentração de sCD40L estava mais alta no grupo AFHU quando comparados ao grupo controle (Figs. 28 e 29, respectivamente). Quando consideramos os pacientes AF e AFHU em um mesmo grupo, a concentração de ambas citocinas está maior no grupo de pacientes do que no grupo controle (Figs. 28 e 29).

Tabela 8. Dados demográficos e hematológicos dos sujeitos controle e dos pacientes com anemia falciforme no *cohort* de Londres.

	CON	AF	AFHU
Masculino/Feminino	8/22	16/25	6/15
Idade	33.1 (30, 22, 61)	33.2 (31, 17, 63) P > 0.05	36.7 (37, 18, 59) P > 0.05
Hemácias (x10¹²L)	4.8 (4.8, 4.2, 5.7)	3.1 (2.9, 1.8, 5.7) P < 0.0001	2.7 (2.4, 1.7, 4.9) P < 0.0001
Hemoglobina (g/dL)	14.5 (14.4, 12.6, 17.1)	8.7 (8.5, 5.6, 12.7) P < 0.0001	9.1 (9.3, 6.3, 12.9) P < 0.0001
Volume corpuscular médio (fL)	89.4 (89.6, 80.1, 95.9)	89.8 (90.3, 68.2, 112.9) P > 0.05	109.4 (109.7, 68.8, 134.4) P < 0.0001
Reticulócitos (%)	–	10.8 (9.2, 3.1, 26.0)	8.0 (7.8, 3.3, 17.4)
Leucócitos (x10⁹L)	6.2 (6.1, 3.8, 9.6)	8.8 (8.6, 3.1, 15.6) P < 0.0001	7.2 (6.4, 2.6, 12.8) P > 0.05
Plaquetas (x10⁹L)	257.2 (242, 174, 366)	368.3 (363, 82, 578) P < 0.0001	341.6 (356, 89, 608) P > 0.05
HbF (%)	0.37 (0.38, 0.1, 1.5)	8.2 (4.6, 0.7, 27.7) P < 0.0001	12.5 (11.2, 0.6, 29.5) P < 0.0001

Com exceção de sexo, todos os dados estão representados como média (mediana, mínimo, máximo) para indivíduos controle (CON), pacientes com anemia falciforme (AF) e pacientes com anemia falciforme em terapia com HU (AFHU). Os valores de P são referentes às comparações com grupo CON.

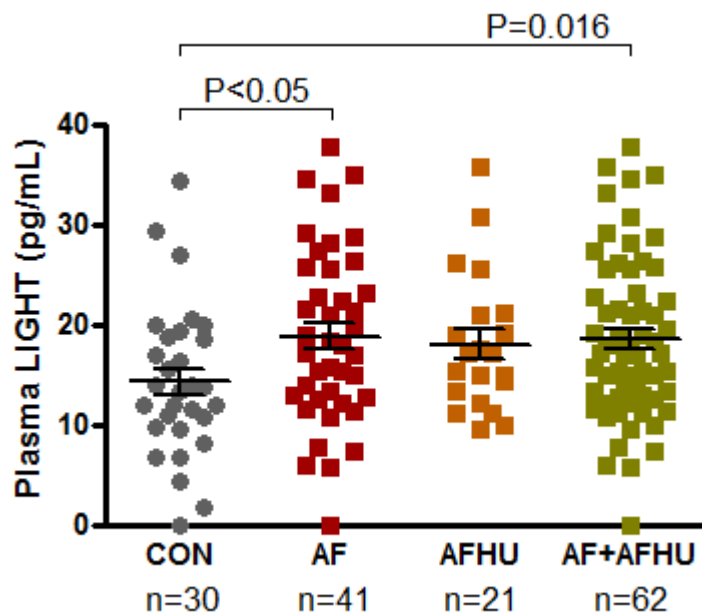


Figura 28. Concentração plasmática de sLIGHT em indivíduos controle (CON), pacientes com anemia falciforme (AF), pacientes com anemia falciforme em terapia com HU (AFHU). Teste de *Kruskal Wallis*.

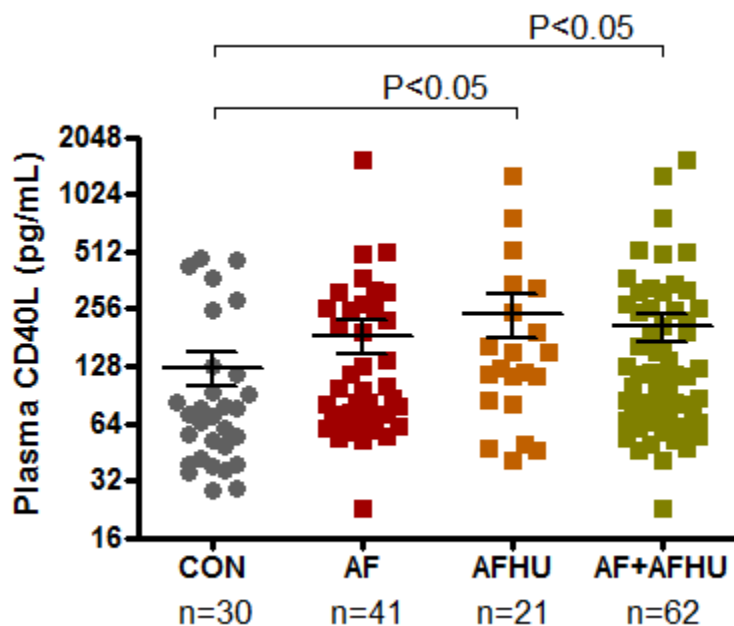


Figura 29. Concentração plasmática de sCD40L em indivíduos controle (CON), pacientes com anemia falciforme (AF), pacientes com anemia falciforme em terapia com HU (AFHU). Teste de *Kruskal Wallis*.

6.19.2 Associação entre a elevada concentração plasmática de sCD40L e a Síndrome Torácica Aguda na anemia falciforme

Para investigar se altas concentrações de sCD40L estariam associadas com alguma complicação clínica, nós utilizamos o valor da mediana na população de pacientes estudada como um *cut-off* para dividir os pacientes em dois grupos. Um grupo com níveis plasmáticos de sCD40L menores que 113.4 pg/mL e outro grupo com níveis maiores que 113.4 pg/mL. Os dados clínicos foram coletados apenas dos pacientes atendidos no King's College Hospital (AF + AFHU; n = 62) e a presença ou ausência de manifestações clínicas foram comparadas nos dois grupos utilizando o teste exato de Fisher. Nenhuma associação foi observada entre altas concentrações de sCD40L e AVC (acidente vascular cerebral), osteonecrose, retinopatia ou priapismo. Entretanto, uma associação significativa foi encontrada com uma população de pacientes com histórico de Síndrome Torácica Aguda. Os dados estão representados na Tabela 9. Confirmando esse resultado, também observou-se que a concentração de sCD40L estava significativamente elevada no plasma de pacientes com anemia falciforme com histórico de Síndrome Torácica Aguda (Fig. 30). Nenhuma associação foi encontrada entre sLIGHT e alguma manifestação clínica no coorte de pacientes de Londres.

Tabela 9. Associação de sCD40L com manifestações clínicas na anemia falciforme.

Complicação clínica	Plasma CD40L <113.4 pg/mL n = 31	Plasma CD40L >113.4 pg/mL n = 31	P-value Fisher's Exact
AVC	3.2 %	9.7 %	P = 0.6124
Osteonecrose	12.9%	16.1 %	P = 1.0000
Retinopatia	9.7 %	29.0 %	P = 0.1056
Priaprismo	33.3 % (n=12)	20.0 % (n=10)	P = 0.6462
Síndrome Torácica Aguda	9.7 %	41.9 %	P = 0.0078

AVC, Acidente Vascular Cerebral.

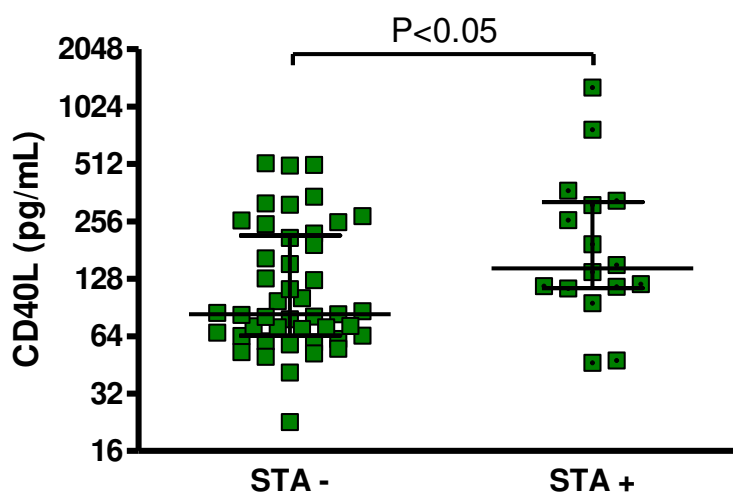


Figura 30. Concentração plasmática de sCD40L em pacientes com anemia falciforme que nunca apresentaram Síndrome Torácica Aguda (STA-) e pacientes com histórico de Síndrome Torácica Aguda (STA+). Teste de *Mann Whitney*.

6.19.3 Correlação entre os níveis plasmáticos de sLIGHT, sCD40L, citocinas inflamatórias e Trombospondina-1 na anemia falciforme

Uma correlação significativa foi observada entre os níveis plasmáticos de sLIGHT e sCD40L apenas quando os pacientes AF e AFHU foram considerados em um mesmo grupo. A concentração de IL-6, MCP-1, TNF- α e Trombospondina-1 (TSP-1) também foi dosada no plasma de CON, pacientes AF e AFHU por ELISA. Os níveis de sLIGHT, em ambos os grupos de pacientes, correlacionaram significativamente com os níveis de TNF- α , enquanto que a concentração de TSP-1 correlacionou com os níveis de sLIGHT apenas no grupo AFHU (Tabela 10). Foi observada uma correlação expressiva entre os níveis plasmáticos de sCD40L e TSP-1 nos grupos AF e AFHU. Curiosamente, apenas o grupo AFHU apresentou uma correlação significativa entre a concentração de CD40L e TNF- α (Tabela 11). Entretanto, nenhuma correlação foi observada entre os níveis de sLIGHT e IL-6 ou MCP-1 ou entre sCD40L e IL-6 ou MCP-1.

Tabela 10. Correlação dos níveis plasmático de sLIGHT com outras citocinas inflamatórias e Trombospondina-1.

	CD40L (pg/mL)	IL-6 (pg/mL)	MCP-1 (pg/mL)	TNF- α (pg/mL)	TSP-1 (ng/mL)
CON	$r^s = -0.088$ $P > 0.05$ $n = 30$	$r^s = 0.09$; $P > 0.05$ $n = 10$	$r^s = -0.164$; $P > 0.05$ $n = 10$	$r^s = 0.463$; $P = 0.01$ $n = 30$	$r^s = 0.283$; $P = 0.13$ $n = 30$
AF	$r^s = 0.300$ $P = 0.055$ $n = 41$	$r^s = -0.238$; $P > 0.05$ $n = 20$	$r^s = -0.27$; $P > 0.05$ $n = 20$	$r^s = 0.453$; $P = 0.003$ $n = 41$	$r^s = 0.285$; $P = 0.071$ $n = 41$
AFHU	$r^s = 0.340$ $P > 0.05$ $n = 21$	$r^s = 0.377$; $P > 0.05$ $n = 10$	$r^s = 0.006$; $P > 0.05$ $n = 10$	$r^s = 0.601$; $P = 0.004$ $n = 21$	$r^s = 0.465$; $P = 0.034$ $n = 21$
AF+AFHU	$r^s = 0.303$ $P = 0.016$ $n = 62$	$r^s = -0.056$; $P > 0.05$ $n = 30$	$r^s = -0.002$; $P > 0.05$ $n = 30$	$r^s = 0.493$; $P < 0.0001$ $n = 62$	$r^s = 0.328$; $P = 0.009$ $n = 62$

Os níveis de sLIGHT no plasma de controles (CON), pacientes com anemia falciforme e pacientes com anemia falciforme em uso de hidroxiureia (AFHU) e pacientes foram correlacionados com níveis plasmáticos de sCD40L, IL-6, MCP-1, TNF- α e Trombospondina-1 (TSP-1). Teste de *Spearman*.

Tabela 11. Correlação dos níveis plasmático de sCD40L com outras citocinas inflamatórias e Trombospondina-1.

	LIGHT (pg/mL)	IL-6 (pg/mL)	MCP-1 (pg/mL)	TNF-α (pg/mL)	TSP-1 (ng/mL)
CON	$r^s = -0.088$ $P > 0.05$ $n = 30$	$r^s = 0.360$; $P > 0.05$ $n = 10$	$r^s = 0.370$; $P > 0.05$ $n = 10$	$r^s = -0.201$; $P > 0.05$ $n = 30$	$r^s = 0.263$; $P > 0.05$ $n = 30$
AF	$r^s = 0.300$ $P = 0.055$ $n = 41$	$r^s = -0.278$; $P > 0.05$ $n = 20$	$r^s = -0.155$; $P > 0.05$ $n = 20$	$r^s = 0.139$; $P > 0.05$ $n = 41$	$r^s = 0.627$; <u>$P < 0.0001$</u> $n = 41$
AFHU	$r^s = 0.340$ $P > 0.05$ $n = 21$	$r^s = 0.018$; $P > 0.05$ $n = 10$	$r^s = 0.152$; $P > 0.05$ $n = 10$	$r^s = 0.574$; <u>$P = 0.006$</u> $n = 21$	$r^s = 0.748$; <u>$P < 0.0001$</u> $n = 21$
AF+AFHU	$r^s = 0.303$ <u>$P = 0.016$</u> $n = 62$	$r^s = 0.191$; $P > 0.05$ $n = 30$	$r^s = -0.097$; $P > 0.05$ $n = 30$	$r^s = 0.269$; <u>$P = 0.035$</u> $n = 62$	$r^s = 0.705$; <u>$P < 0.0001$</u> $n = 62$

Os níveis de sCD40L no plasma de controles (CON), pacientes com anemia falciforme e pacientes com anemia falciforme em uso de hidroxiureia (AFHU) e pacientes foram correlacionados com níveis plasmáticos de sLIGHT, IL-6, MCP-1, TNF- α e Trombospondina-1 (TSP-1). Teste de *Spearman*.

6.19.4 Correlação dos níveis plasmáticos de sLIGHT com parâmetros hematológicos

O hemograma completo e os níveis de hemoglobina foram avaliados em todos os pacientes. Foi observado que os pacientes do grupo AF e AFHU apresentavam uma correlação significativa entre os níveis plasmáticos de sLIGHT e a contagem de leucócitos, linfócitos, monócitos and eosinófilos. Curiosamente, apenas pacientes AF apresentaram uma correlação significativa da concentração plasmática de sLIGHT com a contagem de neutrófilos. Uma correlação positiva foi encontrada entre os níveis de sLIGHT e a contagem de plaquetas nos grupos AF e AFHU, sendo estatisticamente significativa apenas no grupo AF (Tabela 12).

6.19.5 Correlação dos níveis plasmáticos de sLIGHT com variáveis laboratoriais

Todas as amostras de sangue dos pacientes utilizadas neste estudo foram coletadas ao mesmo tempo dos exames de rotina. Os exames de rotinas foram realizados para avaliar a hemólise intravascular (lactato desidrogenase - LDH), inflamação aguda (proteína C-reativa – P-CR), função hepática (proteína total, albumina, globulina e bilirrubina total) e função renal (sódio – Na, potássio – K e creatinina). Nenhuma correlação foi encontrada entre os níveis de sLIGHT e LDH ou P-CR. Entretanto, sLIGHT apresentou uma correlação negativa com os níveis de Na no soro de pacientes AF e uma correlação positiva com os níveis de globulina sérica nos pacientes AFHU (Tabela 13).

Tabela 12. Correlação dos níveis plasmáticos de sLIGHT com parâmetros hematológicos.

	Leucócitos 10 ⁹ /L	Neutrófilos 10 ⁹ /L	Linfócitos 10 ⁹ /L	Monócitos 10 ⁹ /L	Eosinófilo 10 ⁹ /L	Plaquetas 10 ⁹ /L	Hemoglobina g/dL	HbF (%)	Reticulócitos (%)
AF n=41	r ^s =0.504 <u>P=0.0008</u>	r ^s =0.434 <u>P=0.0045</u>	r ^s =0.373 <u>P=0.016</u>	r ^s =0.285 P=0.07	r ^s =0.594 <u>P<0.0001</u>	r ^s =0.378 <u>P=0.015</u>	r ^s =0.102 P=0.526	r ^s = -0.105 P=0.535	r ^s =0.352 <u>P=0.023</u>
AFHU n=21	r ^s =0.487 <u>P=0.025</u>	r ^s =0.285 P=0.209	r ^s =0.542 <u>P=0.011</u>	r ^s =0.47 <u>P=0.031</u>	r ^s =0.557 <u>P=0.008</u>	r ^s =0.376 P=0.092	r ^s = -0.272 P=0.234	r ^s = -0.26 P=0.268	r ^s =0.423 <u>P=0.056</u>
AF+AFHU n=62	r ^s =0.514 <u>P<0.0001</u>	r ^s =0.427 <u>P=0.0005</u>	r ^s =0.397 <u>P=0.0014</u>	r ^s =0.366 <u>P=0.0034</u>	r ^s =0.592 <u>P<0.0001</u>	r ^s =0.394 <u>P=0.0015</u>	r ^s = -0.004 P=0.975	r ^s = -0.204 P=0.129	r ^s =0.316 <u>P=0.012</u>

As correlações foram calculadas usando o teste de *Spearman* e os valores de $P < 0.05$ estão sublinhados. HbF, hemoglobina fetal.

Tabela 13. Correlação dos níveis plasmáticos de sLIGHT com parâmetros laboratoriais.

	PCR	Na	K	Creatinina	Proteína total	Albumina	Globulina	Bilirrubina total	LDH
AF n=41	r ^s = -0.063 P=0.695	r ^s = -0.463 <u>P=0.0023</u>	r ^s =0.036 P=0.823	r ^s = -0.106 P=0.510	r ^s =0.291 P=0.064	r ^s =0.079 P=0.621	r ^s =0.127 P=0.427	r ^s =0.234 P=0.140	r ^s =0.096 P=0.549
AFHU n=21	r ^s = -0.02 P=0.929	r ^s = -0.178 P=0.439	r ^s = -0.125 P=0.59	r ^s =0.124 P=0.592	r ^s =0.361 P=0.107	r ^s = -0.161 P=0.487	r ^s =0.459 <u>P=0.036</u>	r ^s =0.173 P=0.454	r ^s =0.370 P=0.099
AF+AFHU n=62	r ^s = -0.048 P=0.707	r ^s = -0.363 <u>P=0.0038</u>	r ^s = -0.011 P=0.933	r ^s = -0.049 P=0.704	r ^s =0.302 <u>P=0.0169</u>	r ^s =0.008 P=0.946	r ^s =0.230 P=0.072	r ^s =0.214 P=0.094	r ^s =0.183 P=0.154

As correlações foram calculadas usando o teste de *Spearman* e os valores de $P < 0.05$ estão sublinhados. PCR, proteína C-reativa; Na, sódio; K, potássio; LDH, lactato desidrogenase.

6.19.6 Correlação dos níveis plasmáticos de sCD40L com parâmetros hematológicos

Interessantemente, foi observada uma correlação significativa entre os níveis plasmáticos de sCD40L e a contagem de leucócitos, neutrófilos, linfócitos e plaquetas apenas no grupo de pacientes AF. Uma correlação negativa, mas não significativa, foi encontrada entre a concentração de sCD40L, hemoglobina e hemoglobina fetal no grupo de pacientes AF (Tabela 14).

6.19.7 Correlação dos níveis plasmáticos de sCD40L com variáveis laboratoriais

Semelhantemente aos resultados encontrados para sLIGHT, os níveis de sCD40L apresentaram uma correlação negativa significativa com os níveis de *Na* no grupo de pacientes AF e uma correlação positiva, mas não significativa, com os níveis de globulina sérica no grupo AFHU. Entretanto, observou-se também uma correlação significativa entre a concentração plasmática de sCD40L e LDH, somente no grupo AF (Tabela 15).

Tabela 14. Correlação dos níveis plasmáticos de sCD40L com parâmetros hematológicos.

	Leucócitos 10 ⁹ /L	Neutrófilos 10 ⁹ /L	Linfócitos 10 ⁹ /L	Monócitos 10 ⁹ /L	Eosinófilo 10 ⁹ /L	Plaquetas 10 ⁹ /L	Hemoglobina g/dL	HbF (%)	Reticulócitos (%)
AF n=41	r ^s =0.386 <u>P=0.013</u>	r ^s =0.322 <u>P=0.04</u>	r ^s =0.374 <u>P=0.016</u>	r ^s =0.214 P=0.179	r ^s =0.166 P=0.299	r ^s =0.454 <u>P=0.0029</u>	r ^s = -0.276 P=0.081	r ^s = -0.296 P=0.075	r ^s = -0.060 P=0.709
AFHU n=21	r ^s =0.105 P=0.650	r ^s =0.209 P=0.363	r ^s =0.357 P=0.112	r ^s =0.208 P=0.365	r ^s =0.250 P=0.274	r ^s =0.362 P=0.107	r ^s = -0.183 P=0.427	r ^s = -0.190 P=0.424	r ^s =0.104 P=0.654
AF+AFHU n=62	r ^s =0.251 <u>P=0.049</u>	r ^s =0.126 P=0.329	r ^s =0.328 <u>P=0.009</u>	r ^s =0.216 P=0.091	r ^s =0.159 P=0.218	r ^s =0.440 <u>P=0.0003</u>	r ^s = -0.211 P=0.100	r ^s = -0.214 P=0.109	r ^s = -0.081 P=0.530

As correlações foram calculadas usando o teste de *Spearman* e os valores de $P < 0.05$ estão sublinhados. HbF, hemoglobina fetal.

Tabela 15. Correlação dos níveis plasmáticos de sCD40L com parâmetros laboratoriais.

	C-RP	Na	K	Creatinine	Total Protein	Albumina	Globulina	Bilirrubina Total	LDH
AF n=41	r ^s = -0.111 P=0.491	r ^s = -0.382 <u>P=0.014</u>	r ^s = -0.050 P=0.755	r ^s = -0.151 P=0.347	r ^s =0.268 P=0.091	r ^s =0.035 P=0.828	r ^s =0.208 P=0.193	r ^s =0.243 P=0.126	r ^s =0.439 <u>P=0.004</u>
AFHU n=21	r ^s = 0.238 P=0.298	r ^s = 0.068 P=0.771	r ^s = -0.312 P=0.169	r ^s = -0.157 P=0.498	r ^s =0.208 P=0.365	r ^s = -0.040 P=0.863	r ^s =0.418 P=0.059	r ^s =0.046 P=0.843	r ^s =0.042 P=0.858
AF+AFHU n=62	r ^s = -0.068 P=0.600	r ^s = -0.215 P=0.093	r ^s = -0.072 P=0.577	r ^s = -0.172 P=0.182	r ^s =0.207 P=0.107	r ^s = -0.007 P=0.955	r ^s =0.234 P=0.068	r ^s =0.166 P=0.198	r ^s =0.257 <u>P=0.044</u>

As correlações foram calculadas usando o teste de *Spearman* e os valores de $P < 0.05$ estão sublinhados. PCR, proteína c-reativa; Na, sódio; K, potássio; LDH, lactato desidrogenase.

6.19.8 Avaliação da expressão de marcadores de ativação plaquetária nos pacientes com anemia falciforme

Visto que LIGHT e CD40L parecem ser produzidos e secretados por plaquetas ativadas, a expressão de P-selectina e da integrina $\alpha\text{IIb}\beta 3$ na sua conformação ativada foi medida por citometria de fluxo. A expressão da molécula de adesão P-selectina estava significativamente elevada na superfície de plaquetas de pacientes do grupo AF em comparação com o grupo controle (Fig. 31). Não houve diferença estatística na expressão da integrina $\alpha\text{IIb}\beta 3$ nas plaquetas de controles e pacientes (Fig. 32). Nenhuma correlação foi encontrada entre os níveis plasmáticos de sLIGHT ou sCD40L e a expressão desses marcadores de ativação plaquetária.

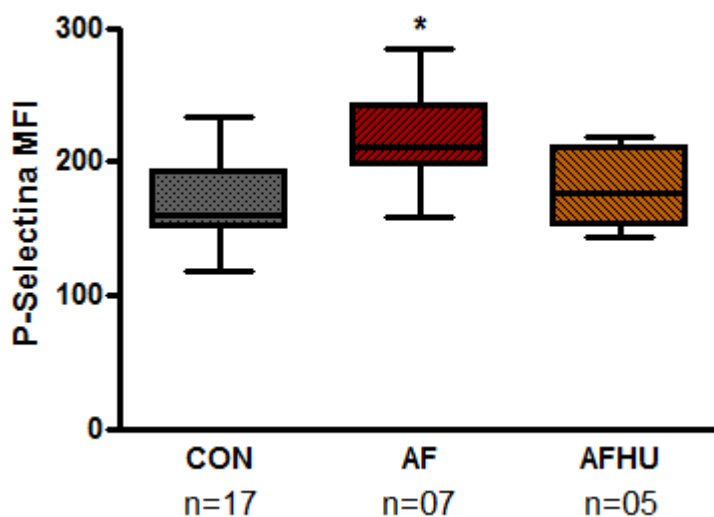


Figura 31. Expressão de P-selectina na superfície de plaquetas de indivíduos controles (CON), pacientes com anemia falciforme (AF) e pacientes com anemia falciforme em tratamento com hidroxiureia (AFHU). Teste de *Kruskal Wallis*, * $P < 0.05$, comparado ao controle.

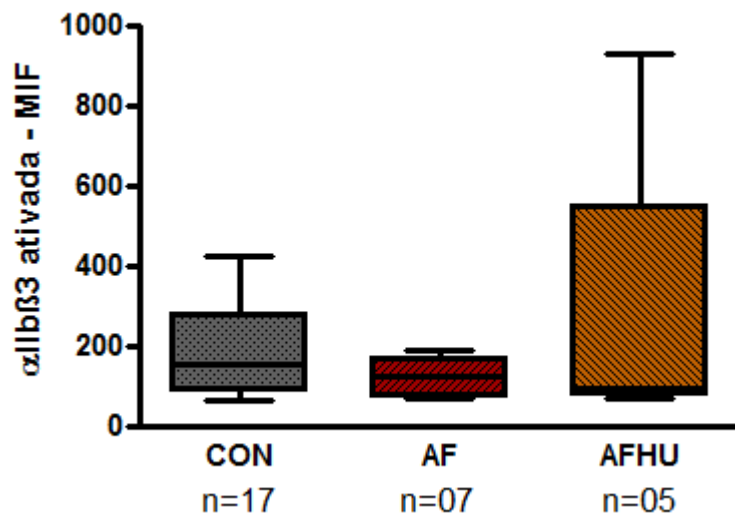


Figura 32. Expressão da integrina $\alpha\text{IIb}\beta 3$ na sua conformação ativada na superfície de plaquetas de indivíduos controles (CON), pacientes com anemia falciforme (AF) e pacientes com anemia falciforme em tratamento com hidroxiureia (AFHU). Teste de *Kruskal Wallis*.

7. DISCUSSÃO

7. DISCUSSÃO

7.1 Produção das citocinas LIGHT e CD40L na anemia falciforme

A anemia falciforme é uma doença resultante de uma simples mutação de ponto no gene da β -globina, mas caracterizada por uma desordem sistêmica associada a episódios agudos de dores, infecções recorrentes e danos progressivos aos órgãos (Frenette e Atweh 2007, Rees, *et al.*, 2010). A crise vaso-oclusiva é a manifestação mais comum desta doença sendo a principal causa de morbidade dos pacientes. Hoje, acredita-se que a crise vaso-oclusiva seja um processo multifatorial, envolvendo as interações entre as células vermelhas, leucócitos ativados, plaquetas, proteínas do plasma e células endoteliais. Recorrentes crises vaso-oclusivas e lesões por isquemia-reperfusão com consequente ativação de células endoteliais induzem uma resposta inflamatória contínua nos indivíduos com anemia falciforme que é propagada pela diminuição da biodisponibilidade de óxido nítrico, aumento do stress oxidativo e por níveis elevados de citocinas pró-inflamatórias (Hebbel *et al.*, 2004; Conran *et al.*, 2009).

LIGHT e CD40L são proteínas transmembrana do tipo II, pertencentes à família do fator de necrose tumoral, que promovem efeitos pró-inflamatórios em leucócitos e células endoteliais. Além de serem expressas em uma variedade de tipos celulares, já foram identificadas em altas concentrações plasmáticas em várias doenças inflamatórias como a aterosclerose (Lee *et al.*, 2001; Liu *et al.*, 2008; Lievens *et al.*, 2009; Lievens *et al.*, 2010). Neste estudo, as citocinas sLIGHT e sCD40L, foram encontradas significativamente elevadas no plasma de pacientes com anemia falciforme e esse aumento foi observado tanto em pacientes em tratamento com hidroxiureia como em pacientes que não faziam o uso desse medicamento. Curiosamente, foi observado que os níveis de sLIGHT também estavam elevados no plasma de pacientes com doença falciforme SC, apesar desses pacientes geralmente apresentarem um quadro clínico menos severo com uma contagem menor do número de plaquetas e de leucócitos (Nagel *et al.*, 2003). Embora em concentrações menores, os pacientes com anemia falciforme do coorte de Londres também apresentaram altos níveis de sLIGHT e sCD40L quando comparados aos indivíduos controle. Esse aumento, encontrado na concentração plasmática de sLIGHT e sCD40L na

anemia falciforme, pode estar contribuindo com a fisiopatogenia da doença perpetuando a inflamação crônica já existente.

A proteína LIGHT é encontrada expressa na superfície de plaquetas ativadas e parece participar na adesão dessas células ao endotélio (Celik *et. al.*, 2007). Neste estudo, observamos que plaquetas de pacientes com anemia falciforme expressavam uma maior quantidade de LIGHT do que plaquetas de indivíduos controle e essa expressão estava associada com a expressão de P-selectina e da integrina $\alpha\text{Ib}\beta 3$, que são marcadores de ativação plaquetária. Podemos sugerir que na anemia falciforme as plaquetas que circulam na corrente sanguínea já estão pré-ativadas, como mostrado por Tomer e colaboradores, quando identificaram que plaquetas de indivíduos com anemia falciforme expressavam mais P-selectina e $\alpha\text{Ib}\beta 3$ do que plaquetas de indivíduos sem a doença (Tomer *et. al.*, 2001). A expressão do receptor de LIGHT, HVEM, em plaquetas foi encontrada aumentada nos pacientes AF, mas não nos pacientes AFHU. Em contraste, a expressão de $\text{LT}\beta\text{R}$ estava ligeiramente elevada na superfície de plaquetas dos pacientes AFHU. Para nosso conhecimento, as expressões de HVEM e $\text{LT}\beta\text{R}$ em plaquetas ainda não foram relatadas na literatura, desta forma, o efeito da ativação desses receptores na função plaquetária não é conhecido. Entretanto, sabe-se que ambos os receptores modulam o processo imune e inflamatório em outros tipos de células, tais como linfócitos T, macrófagos e células endoteliais (Ware, 2009; Xu *et. al.*, 2011).

Após ativação das plaquetas, LIGHT é liberada na sua forma solúvel através de mecanismos que envolvem a ativação da GP IIb/IIIa (integrina $\alpha\text{Ib}\beta 3$) e também da ação de metaloproteinases. A liberação da forma solúvel de LIGHT não segue o padrão de secreção dos α -grânulos, liberando todo o seu conteúdo em alguns minutos, é um processo gradual que leva pelo menos noventa minutos para externalizar a máxima concentração de LIGHT (Otterdal *et. al.*, 2007). A secreção de sLIGHT também foi avaliada e pudemos observar que as plaquetas tanto de pacientes com anemia falciforme quanto de indivíduos controle foram capazes de liberar grandes quantidades de sLIGHT. A ativação das plaquetas com o colágeno induziu uma secreção ainda maior dessa citocina, indicando que as plaquetas podem ser uma importante fonte de sLIGHT na circulação e que o colágeno parece estar envolvido no processo de liberação dessa proteína nas plaquetas.

A proteína LIGHT, além de ser produzida e expressa por plaquetas ativadas, também é encontrada em células T ativadas, monócitos e granulócitos e têm sido implicadas em vários eventos imunes, incluindo a proliferação de células T e B (Cohavy *et. al.*, 2005, Schneider *et. al.*, 2004, Kim *et. al.*, 2005, Lee *et. al.*, 2004). LIGHT se correlacionou significativamente com a contagem de glóbulos brancos, neutrófilos e linfócitos em pacientes com anemia falciforme do coorte de Londres. Curiosamente, sLIGHT também apresentou uma correlação expressiva, com a contagem de eosinófilos. Os eosinófilos têm sido implicados no desenvolvimento de fibrose subepitelial na asma e Doherty e colaboradores relataram um papel importante de LIGHT na remodelação das vias respiratórias nesta doença, principalmente por aumentar a produção de Fator de transformação do crescimento beta (TGF- β) nos macrófagos e também a expressão de interleucina 13 (IL-13) nos eosinófilos.

Não observamos nenhuma diferença entre a expressão de LIGHT na superfície de neutrófilos, linfócitos ou monócitos de indivíduos controles e pacientes com anemia falciforme, apesar desses pacientes apresentarem uma ativação leucocitária mesmo quando não estão em crise. De acordo com Celik *et. al.*, 2009, monócitos circulantes não estimulados não expressam LIGHT em sua superfície, porém esse resultado foi baseado em apenas três experimentos realizados. Em outro estudo, Kang *et. al.*, 2007 observaram que, em média, 20% dos monócitos de indivíduos saudáveis expressam LIGHT em sua superfície, e pacientes com artrite reumatoide apresentam um pequeno aumento nessa expressão. Nossos resultados mostraram que a expressão de LIGHT na superfície dos monócitos de indivíduos controle e pacientes com anemia falciforme apresenta uma grande variação, apresentando um coeficiente de variação de aproximadamente 80% em todos os grupos.

Assim como LIGHT, a expressão de CD40L pode ser observada na superfície de plaquetas ativadas, sendo quase indetectável em plaquetas não estimuladas (Henn *et. al.*, 1998). Ao contrário dos resultados encontrados sobre LIGHT, a expressão de CD40L nas plaquetas foi praticamente ausente tanto nos controles como nos pacientes com anemia falciforme. De acordo com Henn e colaboradores, após a ativação das plaquetas, o CD40L é translocado para a superfície dessas células e em um minuto a expressão máxima é alcançada, depois disso, a expressão do CD40L vai gradualmente diminuindo (Henn *et. al.*,

1998). Como as plaquetas de indivíduos com anemia falciforme parecem estar cronicamente ativadas na circulação, no momento em que as amostras foram coletadas é possível que essas plaquetas já não expressassem mais CD40L em sua superfície.

A molécula CD40L também existe na forma trimérica solúvel, a qual é secretada após a ativação das plaquetas por um processo longo e gradual de clivagem dependente de metaloproteinases e também da ativação da GP IIb/IIIa (integrina α IIb β 3), visto que antagonistas desta glicoproteína são capazes de inibir a liberação de sCD40L nessas células (Jin *et. al.*, 2001, Furman *et. al.*, 2004 e Otterdal *et. al.*, 2004). Embora Lee *et. al.*, 2006 tenha relatado que plaquetas de pacientes com anemia falciforme, após serem lisadas, possuem menos sCD40L do que plaquetas de indivíduos controle, nossos resultados mostraram que, em noventa minutos, plaquetas lavadas de pacientes secretaram mais sCD40L do que plaquetas controles. Esses dados fortalecem a teoria de que sCD40L não é liberado pelos α -grânulos e sim por mecanismos alternativos. O processo de secreção das proteínas sLIGHT e sCD40L possuem vários aspectos em comum, ambos são gradativos, envolvem a ativação da glicoproteína GP IIb/IIIa e a ação de metaloproteinases. Curiosamente, observamos uma correlação bastante significativa entre os níveis de sLIGHT e sCD40L secretados por plaquetas de pacientes com anemia falciforme. Essa correlação, entre sLIGHT e sCD40L, também pôde ser observada no plasma desses pacientes, indicando que a liberação dessas duas citocinas pelas plaquetas podem estar de alguma forma associadas.

Ao contrário da expressão de CD40L, que pode ser observada somente quando as plaquetas estão ativadas, a expressão do seu receptor, CD40, é encontrada constitutivamente na superfície de plaquetas não estimuladas. Henn e colaboradores mostraram que a secreção de sCD40L pelas plaquetas é gerada em resposta à interação CD40-CD40L, pois o processo de solubilização é abolido quando o receptor CD40 está ligado a um anticorpo bloqueador da sua função (Henn *et. al.*, 2001). Pacientes com anemia falciforme apresentaram uma maior expressão do receptor CD40 na superfície das plaquetas, sendo significativamente maior nos pacientes em terapia com hidroxiureia. Nossos dados sugerem que a via de interação CD40-CD40L nas plaquetas pode estar alterada na anemia falciforme, promovendo uma maior secreção do sCD40L na circulação.

No mesmo estudo realizado por Henn *et. al.*, 2001, foi observado que a forma solúvel de CD40L liberada pelas plaquetas, em contraste com o CD40L ligado a membrana, não consegue induzir uma resposta inflamatória nas células endoteliais. Divergindo desses resultados, Lee e colaboradores demonstraram que o sCD40L presente no plasma está biologicamente ativo na anemia falciforme sendo capaz de induzir a expressão de ICAM-1 nas células endoteliais e a produção de fator tecidual em monócitos (Lee *et. al.*, 2006). Desta forma, continuam desconhecidos quais os mecanismos que restringem a ação do CD40L na circulação para evitar uma inflamação sistêmica descontrolada.

O CD40L foi originalmente identificado como uma molécula de superfície expressa em células T ativadas, sendo bastante importante para a indução da proliferação de células B. Subsequentemente, CD40L foi encontrado expresso em uma variedade de células, incluindo monócitos, células dendríticas, mastócitos, eosinófilos, células B e plaquetas (Graf *et.al.*, 1992; van Kooten *et.al.*, 2000; Spriggs *et.al.*, 1992; Gauchat *et.al.*, 1992; Buchner *et.al.*, 2003). Apesar de termos observado que a expressão de CD40L é praticamente ausente na superfície dos neutrófilos, linfócitos e monócitos de pacientes e controles, uma correlação bastante curiosa foi encontrada entre os níveis plasmáticos de sCD40L e a contagem de leucócitos, neutrófilos e linfócitos apenas dos pacientes do coorte de Londres que não faziam o uso de hidroxiureia. Diante deste resultado, podemos sugerir que o CD40L ou a ativação plaquetária pode estar, de alguma forma, envolvido no aumento da proliferação dos leucócitos na anemia falciforme.

7.2 Papel das citocinas LIGHT e CD40L na fisiopatogenia da anemia falciforme

Estudos realizados com a proteína LIGHT recombinante sugerem um efeito pró-inflamatório dessa citocina, pois em contato com HUVECs ou monócitos *in vitro*, LIGHT é capaz de induzir a produção de IL-8 e MCP-1 nessas células de forma dose dependente. Resultados similares foram encontrados quando HUVECs ou monócitos foram incubados com o sobrenadante de plaquetas ativadas de indivíduos saudáveis. O aumento da produção de IL-8 e MCP-1 nessas células é parcialmente abolido na presença de anticorpos bloqueadores anti-LIGHT, indicando que a forma solúvel dessa citocina está biologicamente ativa na circulação (Otterdal *et. al.*, 2006; Sandberg *et. al.*, 2009). Nossos

resultados mostram que LIGHT e IL-8 se correlacionam significativamente no plasma de pacientes com anemia falciforme em terapia, ou não, com hidroxiureia. Embora nenhuma correlação tenha sido encontrada entre LIGHT e MCP-1, esses dados indicam que LIGHT poderia estar colaborando para a produção de IL-8 na anemia falciforme gerando assim sinais para o recrutamento de leucócitos.

Uma correlação estatisticamente significativa também foi encontrada entre a concentração de LIGHT e TNF- α no plasma de pacientes dos grupos AF e AFHU como também no grupo controle. A incubação de LIGHT recombinante com monócitos e neutrófilos induz a produção de IL-8 and TNF- α nessas células, possivelmente através da ligação com receptor HVEM (Heo *et. al.*, 2006). TNF- α é uma molécula pro-inflamatória que está envolvida na ativação de células endoteliais e leucócitos e está elevada no plasma de pacientes com anemia falciforme (Viemann *et. al.*, 2006; Lanaro *et. al.*, 2009). A correlação encontrada entre LIGHT e TNF- α enfatiza a possível participação dessas citocinas na inflamação crônica presente na anemia falciforme.

A Trombospondina-1 é uma glicoproteína multifuncional que está abundantemente presente nos α -grânulos das plaquetas, sendo secretada mediante ativação dessas células. Essa proteína, quando ligada ao receptor CD47, regula a resposta vascular à hipóxia, vasoconstrição, além de inibir a angiogênese. A trombospondina-1, que já foi associada às crises vaso-oclusivas, também se liga ao receptor CD36 e à fosfatidilserina presente nas hemácias, promovendo a adesão dessas células ao endotélio (Sugihara *et. al.*, 1993; Brittain *et. al.*, 1993; Browne *et. al.*, 1996; Bonnefoy *et. al.*, 2008; Novelli *et. al.*, 2012). Nós observamos que os níveis plasmáticos de CD40L se correlacionaram significativamente com a concentração de Trombospondina-1 nos pacientes com anemia falciforme e essa correlação foi ainda mais expressiva nos pacientes em terapia com hidroxiureia.

Para explorar o papel de LIGHT e CD40L como biomarcadores e definir suas associações com complicações clínicas na anemia falciforme utilizamos o teste de Fisher para analisar o coorte de pacientes do Hemocentro da UNICAMP e do King's College Hospital.

Uma subpopulação de pacientes do coorte da UNICAMP apresentou níveis plasmáticos de LIGHT extremamente elevados, deste modo, nós investigamos se alguma complicação clínica seria mais frequente nesses pacientes. Interessantemente, uma

associação significativa entre altos níveis de LIGHT e a elevada velocidade de regurgitação tricúspide (≥ 2.5 m/s) foi encontrada nos pacientes com anemia falciforme. A hipertensão pulmonar é uma complicação da anemia falciforme que está relacionada com o aumento da mortalidade (Castro e Gladwin, 2005). Embora, para diagnosticar essa doença, seja preciso fazer a mensuração direta da pressão da artéria pulmonar através de cateterismo, a velocidade de regurgitação da tricúspide igual ou superior a 2.5 m/s (avaliada por eco cardiograma com doppler) é considerada um indicativo de hipertensão pulmonar (Hassel, 2011). Nossos dados sugerem que elevadas concentrações de LIGHT podem estar associadas à indicações clínicas de hipertensão pulmonar na anemia falciforme.

Quando avaliamos os pacientes do coorte de Londres observamos que os níveis de CD40L estavam significativamente maiores no plasma de pacientes com histórico de síndrome torácica aguda do que no plasma de pacientes que nunca apresentaram essa complicação clínica. Essa associação também pode ser observada utilizando o teste de Fisher. Pacientes com síndrome torácica aguda têm uma alta incidência de embolia pulmonar e uma concentração elevada de Trombospondina-1 no plasma (Vichinsky *et. al.*, 2000; Mekontso *et. al.*, 2011; Novelli *et. al.*, 2012). Apesar de não termos encontrado nenhuma associação entre a concentração plasmática de Trombospondina-1 e a síndrome torácica aguda nos pacientes com anemia falciforme, os níveis de CD40L se correlacionaram expressivamente com os níveis de Trombospondina-1, sugerindo que as plaquetas parecem exercer algum papel no desenvolvimento dessa complicação clínica.

Como esses dados derivam de um pequeno coorte de pacientes, futuras investigações, com uma população maior de pacientes, devem ser realizadas para confirmar esses achados interessantes.

7.3 Efeitos da Hidroxiureia

Embora alguns estudos tenham reportado uma diminuição dos níveis plasmáticos de alguns mediadores inflamatórios, como sICAM-1, sVCAM-1 e TNF- α , em pacientes em tratamento com hidroxiureia (Saleh *et. al.*, 1999; Conran *et. al.*, 2004; Lanaro *et. al.*, 2009), neste estudo nenhuma alteração foi observada na concentração de LIGHT ou CD40L no grupo de pacientes AFHU do coorte do Brasil ou de Londres. Esses resultados são interessantes pois indicam que a hidroxiureia parece não ser capaz de melhorar os níveis de

todos os mediadores inflamatórios que estão alterados na anemia falciforme, como já observado em outros estudos (Saleh *et. al.*, 1998; Saleh *et. al.*, 1999; Lanaro *et. al.*, 2009). Como tal, parece ser importante a identificação de novas terapias para a utilização em associação com HU para reduzir eficazmente a inflamação vascular presente nesta doença.

Curiosamente, apenas no grupo AFHU nós observamos uma correlação significativa de LIGHT com Trombospondina-1 e de CD40L com TNF- α , e também, apenas nesse grupo foi observada uma correlação entre a concentração plasmática de Trombospondina-1 e TNF- α . Novamente podemos sugerir que a hidroxiureia é incapaz de suprimir todas as vias da inflamação na anemia falciforme e que as plaquetas parecem contribuir com o processo inflamatório nos pacientes em terapia com essa droga.

Apesar da terapia com hidroxiureia não ter sido associada a qualquer alteração nos níveis plasmáticos de CD40L, esta droga pode estar modulando parcialmente a via desta citocina nos leucócitos, visto que as correlações encontradas entre a concentração de CD40L e a contagem de leucócitos, neutrófilos e linfócitos foram observadas apenas em pacientes com anemia falciforme que não faziam uso de hidroxiureia.

O DcR3 é uma proteína solúvel da família dos receptores do fator de necrose tumoral que tem a função de atenuar os efeitos de LIGHT e também de outras duas proteínas da família do TNF, o Fas Ligand e o TNF-like molécula 1A. Essa proteína já foi encontrada super expressa em doenças inflamatórias indicando ser um alvo terapêutico promissor para condições inflamatórias (Lin e Hsieh, 2011). Enquanto a concentração de DcR3 estava ligeiramente aumentada no plasma de pacientes AF, nos pacientes AFHU os níveis estavam significativamente elevados quando comparados ao grupo controle, sugerindo que um dos efeitos benéficos da hidroxiureia na anemia falciforme poderia ser a regulação do imunomodulador DcR3 para neutralizar os efeitos de citocinas da família do TNF, como o LIGHT.

7.4 Papel das plaquetas e seus mediadores inflamatórios, LIGHT e CD40L, na ativação de leucócitos e células endoteliais

LIGHT é um ligante para dois receptores diferencialmente expressos da família do TNF, o HVEM, expresso predominantemente em células T, e o LT β R, encontrado principalmente em células endoteliais e do estroma (Mauri *et. al.*, 1998; Browning *et. al.*,

1996; Chang *et. al.*, 2005). Resultados de vários estudos indicam que a LIGHT pode desencadear a apoptose, assim como a ativação das células, dependendo, em parte, da expressão dos seus receptores nas células alvo (Rooney *et. al.*, 2000; Zhai *et. al.*, 1998). Alguns estudos mostraram que LIGHT é capaz de induzir a produção de IL-8, TNF- α , MCP-1 e espécies reativas do oxigênio em neutrófilos e monócitos (Heo *et. al.*, 2006; Otterdal *et. al.*, 2006). Em linfócitos, a interação LIGHT-HVEM atua como um sinal de co-estimulação aumentando a produção de citocinas pró-inflamatórias e a proliferação das células T (Tamada *et. al.*, 2000). A expressão dos receptores de LIGHT foi avaliada nos neutrófilos, linfócitos e monócitos e observamos uma expressão baixa de LT β R em neutrófilos e monócitos e praticamente ausente nos linfócitos de pacientes e controles. Pacientes AF em terapia com hidroxiureia apresentaram uma maior expressão de HVEM na superfície dos linfócitos, enquanto que não houve diferença na expressão desse receptor em neutrófilos e monócitos entre os grupos. Entretanto foi observado que uma grande porcentagem dos monócitos de pacientes e controles expressam HVEM em sua superfície, sugerindo que essas células podem ser mais suscetíveis aos efeitos de LIGHT do que os neutrófilos e linfócitos na anemia falciforme. Esses resultados são semelhantes aos encontrados por Heo e colaboradores, que observaram uma expressão elevada de HVEM em neutrófilos e monócitos, entretanto, não detectou a expressão do LT β R nessas células (Heo *et. al.*, 2006).

A proteína CD40L, através da ligação com o seu receptor CD40, promove a síntese de IL-1, IL-6, e TNF- α em monócitos (Stout e Suttles, 1996) e, em neutrófilos de camundongos com sepse induzida, CD40L derivado de plaquetas induz a regulação da integrina Mac-1 na superfície dessas células. Enquanto a expressão de CD40L mostrou-se extremamente baixa nos leucócitos de pacientes e controles, observamos que a expressão do seu receptor, CD40, estava aumentada nos neutrófilos, linfócitos e monócitos dos pacientes com anemia falciforme. Esses resultados indicam que a via de interação CD40-CD40L pode estar alterada na anemia falciforme, induzindo a ativação dos leucócitos.

Indivíduos com anemia falciforme apresentam uma leucocitose moderada, não associada a infecções, que está relacionada com o aumento da morbidade e mortalidade desses pacientes (Platt *et. al.*, 1994). Estudos em animais e humanos indicam que a adesão de leucócitos à outros tipos celulares e ao endotélio é muito importante na patogênese da

vaso-oclusão, pois essas células efetivamente reduzem o diâmetro do lúmen do vaso, resultando na redução do fluxo sanguíneo (Frenette 2002; Frenette 2004; Osarogiagbon *et. al.*, 2000). A interação das plaquetas com os leucócitos resulta na ativação dessas células com a formação de agregados heterocelulares, facilitando a adesão ao endotélio (Diacovo *et. al.*, 1996; Diacovo *et. al.*, 1998; da Costa Martins *et. al.*, 2006; Ott *et. al.*, 1996). A formação de agregados plaquetas-monócitos e plaquetas-neutrófilos é bastante comum na circulação de indivíduos com anemia falciforme (Wun *et. al.*, 2002; Polanowska-Grabowska *et. al.*, 2010), dessa forma avaliamos se plaquetas de pacientes com essa doença seriam capazes de ativar leucócitos de controles. Em neutrófilos, observamos que plaquetas de controles, assim como de pacientes, mostraram uma tendência em aumentar a expressão das moléculas CD66b, CD11a e CD11b, enquanto que em monócitos não houve diferença significativa na expressão de CD11b ou fator tecidual. Apesar das plaquetas não terem induzido o aumento da expressão de ICAM-1 nos linfócitos controle, observamos que as plaquetas de indivíduos com anemia falciforme promoveram a expressão da molécula CD69. O CD69 é considerado um marcador de ativação de linfócitos T, pois é uma das primeiras moléculas a ser expressa na superfície dessas células após estímulo dos receptores TCR. Uma vez expressa, funciona como uma molécula co-estimulatória para a ativação e a proliferação das células T (Ziegler *et. al.*, 1994).

Foi observado que indivíduos com anemia falciforme apresentam um maior número de monócitos pró-inflamatórios na circulação do que indivíduos saudáveis e curiosamente as plaquetas de pacientes foram capazes de induzir o fenótipo pró-inflamatório em monócitos de controles. Monócitos circulantes compreendem diferentes subpopulações com propriedades infiltrativas e migratórias distintas, que podem ser distinguidos com base na expressão diferencial dos marcadores de superfície CD14 e CD16. Monócitos CD14⁺ CD16⁻ são denominados *clássicos* ou *inflamatórios* e CD14⁺ CD16⁺ denominados *não clássicos* ou *pró-inflamatórios*. A origem de cada subgrupo ainda se mantém polêmica. É de consenso geral que a subpopulação de monócitos clássicos, que compreende mais de 80% do total de monócitos circulantes, origina-se de células progenitoras da medula óssea, porém ainda não está claro se os monócitos pró-inflamatórios se originam da medula óssea ou se evoluem a partir de monócitos clássicos (Ancuta *et. al.*, 2009; Weber *et. al.*, 2000). De acordo com Passacuale e colaboradores, a interação de monócito com plaquetas

ativadas induz a expressão da molécula CD16 em monócitos CD14⁺ CD16⁻, aumentando a adesividade dessas células ao endotélio ativado (Passacuale *et. al.*, 2011). Nossos resultados sugerem que as plaquetas de pacientes com anemia falciforme por já se encontrarem em um estado ativado podem estar predispostas a interagirem com os monócitos, induzindo a ativação dessas células.

A inflamação e o dano endotelial possuem um papel fundamental na fisiopatogenia do processo vaso-oclusivo. Evidências de estresse do endotélio incluem o aumento dos níveis de moléculas de adesão na circulação, como VCAM-1 solúvel, e das células endoteliais circulantes durante as crises de dor. Solovey e colaboradores evidenciaram que o endotélio na anemia falciforme está ativado, mostrando que células endoteliais circulantes da microvasculatura possuem um fenótipo pró-coagulante e pró-inflamatório, pois expressam fator tecidual, VCAM-1, ICAM-1, E-selectina, e P-selectina (Sowemimo-Coker *et. al.*, 1989; Duits *et. al.*, 1996; Solovey *et. al.*, 1997 e 1998).

Estudos anteriores do nosso grupo de pesquisa mostrou que as plaquetas na AF possuem uma capacidade aumentada de aderirem ao endotélio e o ativar (Proença-Ferreira *et. al.*, 2010; Proença-Ferreira *et. al.*, no prelo); quando aderidas, plaquetas induzem a produção quimiocinas e moléculas de adesão nas células endoteliais, facilitando o recrutamento de leucócitos (Henn *et. al.*, 1998; Kuckleburg *et. al.*, 2011). Vários estudos tem relatado que LIGHT e CD40L são potentes indutores da expressão das moléculas de adesão ICAM-1, VCAM-1 e E-selectina e da produção das quimiocinas IL-8 e MCP-1 nas células endoteliais (Celik *et. al.*, 2009; Celik *et. al.*, 2007; Otterdal *et. al.*, 2006; Henn *et. al.*, 1998; Cipollone *et. al.*, 2005; Urbich *et. al.*, 2002). Neste estudo foi observado que as plaquetas de pacientes com anemia falciforme induzem uma maior expressão de ICAM-1 em HUVECs do que as plaquetas de indivíduos controle, sendo que esta expressão foi praticamente abolida quando anticorpos bloqueadores da citocina CD40L foram adicionados juntamente com as plaquetas sobre as células endoteliais. Resultados semelhantes foram encontrados na presença de anticorpos anti-LIGHT. Embora não tenham sido estatisticamente significativos, uma correlação significativa foi encontrada entre os níveis plasmáticos de LIGHT e ICAM-1. Esses dados são mais uma evidência de que as plaquetas podem estar contribuindo com a inflamação vascular presente na anemia

falciforme e as citocinas pró-inflamatórias LIGHT e CD40L parecem exercer um papel importante neste contexto.

8. CONCLUSÕES

8. CONCLUSÕES

As proteínas pró-inflamatórias, LIGHT e CD40L, estão elevadas no plasma dos pacientes com anemia falciforme e as plaquetas parecem contribuir para a produção desses mediadores.

Elevados níveis de LIGHT e CD40L estão associados a alterações em outros marcadores da inflamação, provavelmente por estarem participando ou refletindo o estado pró-inflamatório e pró-trombótico encontrado na anemia falciforme.

A terapia com hidroxiureia não foi associada a qualquer alteração dos níveis de LIGHT ou CD40L, enfatizando a importância da identificação de novos alvos terapêuticos para, juntamente com a hidroxiureia, reduzir de forma eficaz a inflamação vascular presente na anemia falciforme.

Dados sugerem que LIGHT e CD40L poderiam contribuir com a ativação dos leucócitos e do endotélio, exercendo um papel importante na fisiopatogenia da anemia falciforme e aparentemente nas manifestações clínicas desta doença, como a hipertensão pulmonar e a síndrome torácica aguda.

Os resultados encontrados neste estudo evidenciam a importância que as plaquetas e seus mediadores inflamatórios, LIGHT e CD40L, podem ter na propagação da inflamação vascular presente na anemia falciforme, se tornando possíveis alvos para novas abordagens terapêuticas.

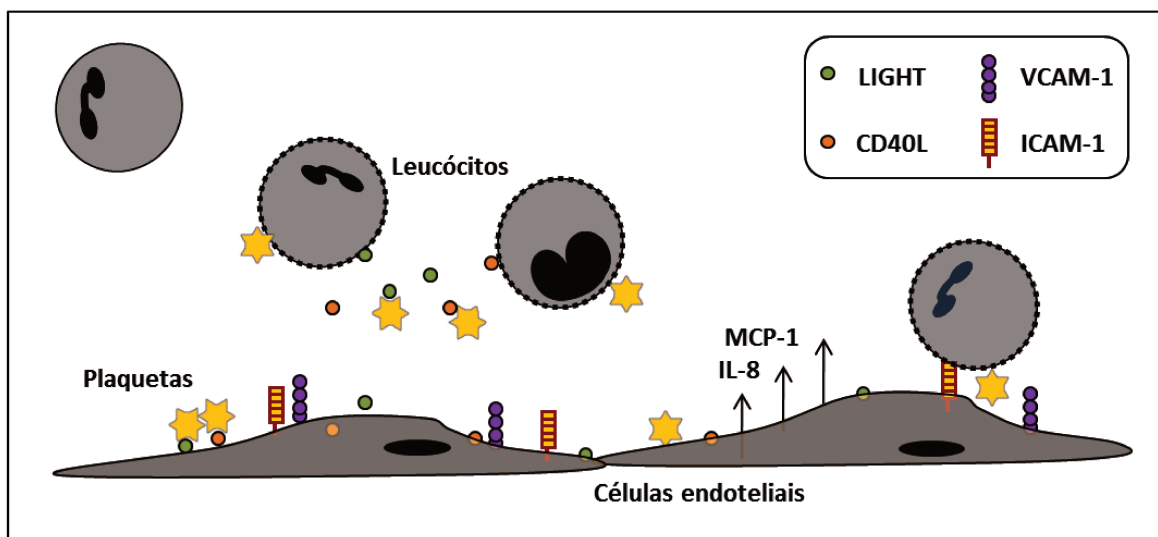


Figura 33. Possível papel das plaquetas e seus mediadores inflamatórios, LIGHT e CD40L, na ativação de leucócitos e células endoteliais. As plaquetas, quando ativadas, expressam e secretam as citocinas LIGHT e CD40L. Essas citocinas, na sua forma solúvel ou expressas na superfície das plaquetas, podem induzir uma resposta inflamatória nas células endoteliais através da regulação da expressão de moléculas de adesão e da produção de quimiocinas, gerando sinais para o recrutamento de leucócitos. LIGHT e CD40L, derivados das plaquetas, também podem interagir com os leucócitos, promovendo a ativação dessas células e o aumento da suas propriedades adesivas. Essas interações entre plaquetas-endotélio e plaquetas-leucócitos parecem ter um papel importante na propagação da inflamação na anemia falciforme.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Altmann DM, Hogg N, Trowsdale J, Wilkinson D. Cotransfection of ICAM-1 and HLA-DR reconstitutes human antigen-presenting cell function in mouse L cells. *Nature* 1989; 6;338(6215):512-4.
- Belcher JD, Bryant CJ, Nguyen J, et al. Transgenic sickle mice have vascular inflammation. *Blood* 2003; 101: 3953–59.
- Belcher JD, Mahaseth H, Welch TE, Vilback AE, Sonbol KM, Kalambur VS, et al. Critical role of endothelial cell activation in hypoxia-induced vasoocclusion in transgenic sickle mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005; 288: H2715-25.
- Bonnefoy A, Moura R, Hoylaerts MF. The evolving role of thrombospondin-1 in hemostasis and vascular biology. *Cell Mol Life Sci* 2008; 65:713–727.
- Brittain HA, Eckman JR, Swerlick RA, et al. Thrombospondin from activated platelets promotes sickle erythrocyte adherence to human microvascular endothelium under physiologic flow: A potential role for platelet activation in sickle cell vaso-occlusion. *Blood* 1993; 81:2137–2143.
- Brittenham GM, Schechter AN, Noguchi CT. Hemoglobin S polymerization: primary determinant of the hemolytic and clinical severity of the sickling syndromes. *Blood* 1985; 65: 183–89.
- Browne PV, Mosher DF, Steinberg MH, Hebbel RP. Disturbance of plasma and platelet thrombospondin levels in sickle cell disease. *Am J Hematol* 1996; 51(4):296-301.
- Browning JL, Miatkowski K, Sizing I, Griffiths D, Zafari M, Benjamin CD, Meier W, Mackay F. Signaling through the lymphotoxin beta receptor induces the death of some adenocarcinoma tumor lines. *J Exp Med* 1996; 183(3):867-78.
- Buchner K, Henn V, Grafe M, de Boer OJ, Becker AE, Kroczeck RA. CD40 ligand is selectively expressed on CD4+ T cells and platelets: implications for CD40–CD40L signaling in atherosclerosis. *J Pathol* 2003; 201: 288–295.

- Canalli AA, Franco-Penteado CF, Saad STO, Conran N, Costa FF. Increased Adhesive Properties of Neutrophils in Sickle Cell Disease May Be Reversed by Pharmacological Nitric Oxide Donation. *Haematologica* 2008; 93: 605-9.
- Canalli AA, Franco-Penteado CF, Traina F, Saad STO, Costa FF, Conran N. Role for cAMP-protein Kinase A signalling in augmented neutrophil adhesion and chemotaxis in sickle cell disease. *European Journal of Haematology* 2007; 79: 330-7.
- Castro O, Gladwin MT. Pulmonary hypertension in sickle cell disease: mechanisms, diagnosis, and management. *Hematol Oncol Clin North Am* 2005; 19(5):881-96.
- Celik S, Langer H, Stellos K, et al. Platelet-associated LIGHT (TNFSF14) mediates adhesion of platelets to human vascular endothelium. *Thromb Haemost* 2007; 98:798-805.
- Celik S, Shankar V, Richter A, Hippe HJ, Akhavanpoor M, Bea F, Erbel C, Urban S, Blank N, Wambsganss N, Katus HA, Dengler TJ. Proinflammatory and prothrombotic effects on human vascular endothelial cells of immune-cell-derived LIGHT. *European Journal of Medical Research* 2009; 14: 147-156.
- Chang YH, Hsieh SL, Chao Y, Chou YC, Lin WW. Proinflammatory effects of LIGHT through HVEM and LTbetaR interactions in cultured human umbilical vein endothelial cells. *J Biomed Sci* 2005;12(2):363-75.
- Charache S, Terrin ML, Moore RD, et al. Effect of hydroxyurea on frequency of painful crises in sickle cell anemia. *N Engl J Med* 1995; 332: 1317–22.
- Charo IF, Ransohoff RM. The many roles of chemokines and chemokine receptors in inflammation. *N Engl J Med* 2006; 354: 610–621.
- Cipollone F, et al. Enhanced soluble CD40 ligand contributes to endothelial cell dysfunction in vitro and monocyte activation in patients with diabetes mellitus: effect of improved metabolic control. *Diabetologia* 2005; 48: 1216–1224.
- Cohavy O, Zhou J, Ware CF, Targan SR. LIGHT is constitutively expressed on T and NK cells in the human gut and can be induced by CD2-mediated signaling. *J Immunol.* 2005 15;174(2):646-53.

- Conran N, Costa FF, Hemoglobin disorders and endothelial cell interactions, *Clin Biochem.* 2009; 42:1824-38.
- Conran N, Fattori A, Saad STO, Costa FF. Increased levels of soluble ICAM-1 in the plasma of sickle cell patients are reversed by hydroxyurea. *American Journal of Hematology.* 2004; 76:343-347.
- Conran N, Franco-Penteado CF, Costa FF. Newer aspects of the pathophysiology of sickle cell disease vaso-occlusion. *Hemoglobin* 2009;33:1–16.
- Cotran RS, Kumar V, Collins T. Robbins Patologia Estrutural e Funcional; tradução João Lobato do Santos e Wilhermo Torres. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000.
- Croizat H. Circulating cytokines in sickle cell patients during steady state. *Br J Haematol* 1994;87:592–7.
- da Costa Martins PA, van Gils JM, Mol A, Hordijk PL, Zwaginga JJ. Platelet binding to monocytes increases the adhesive properties of monocytes by up-regulating the expression and functionality of beta1 and beta2 integrins. *J Leukoc Biol.* 2006 Mar;79(3):499-507. Epub 2006 Jan 13.
- de Caterina R, Libby P, Peng HB, et al. Nitric oxide decreases cytokine-induced endothelial activation. Nitric oxide selectively reduces endothelial expression of adhesion molecules and proinflammatory cytokines. *J Clin Invest.* 1995; 96: 60–68.
- de Franceschi L, Baron A, Scarpa A, et al. Inhaled nitric oxide protects transgenic SAD mice from sickle cell disease-specific lung injury induced by hypoxia/reoxygenation. *Blood* 2003;102:1087–96.
- Diacovo TG, Catalina MD, Siegelman MH, von Andrian UH. Circulating activated platelets reconstitute lymphocyte homing and immunity in L-selectin-deficient mice. *J Exp Med* 1998; 187: 197–204.
- Diacovo TG, Puri KD, Warnock RA, Springer TA, von Andrian UH. Platelet-mediated lymphocyte delivery to high endothelial venules. *Science* 1996; 273: 252–5.
- Doherty TA, Soroosh P, Khorram N, Fukuyama S, Rosenthal P, Cho JY, Norris PS, Choi H, Scheu S, Pfeffer K, Zuraw BL, Ware CF, Broide DH, Croft M. The tumor necrosis

- factor family member LIGHT is a target for asthmatic airway remodeling. *Nature Medicine*. 2011; 17:596–603.
- Duits AJ, Pieters RC, Saleh AW, et al. Enhanced levels of soluble VCAM-1 in sickle cell patients and their specific increment during vasoocclusive crisis. *Clin Immunol Immunopathol* 1996; 81: 96–98.
- Francis Jr RB, Haywood LJ. Elevated immunoreactive tumor necrosis factor and interleukin-1 in sickle cell disease. *J Natl Med Assoc* 1992;84:611–5.
- Frenette PS, Atweh GF. Sickle cell disease: old discoveries, new concepts, and future promise. *J Clin Invest*. 2007; 117:850–858.
- Frenette PS. Sickle cell vaso-occlusion: heterotypic, multicellular aggregations driven by leukocyte adhesion. *Microcirculation* 2004; 11:167–177.
- Frenette PS. Sickle cell vaso-occlusion: multistep and multicellular paradigm. *Curr Opin Hematol* 2002; 9:101–106.
- Furman MI, Krueger LA, Linden MD, Barnard MR, Frelinger AL 3rd, Michelson AD. Release of soluble CD40L from platelets is regulated by glycoprotein IIb/IIIa and actin polymerization. *J Am Coll Cardiol*. 2004 Jun 16;43(12):2319-25.
- Galley HF, Webster NR. Physiology of the endothelium. *Br J Anaesth*. 2004;93:105–13.
- Gambero S, Canalli AA, Traina F, Albuquerque DM, Saad ST, Costa FF, et al. Therapy with hydroxyurea is associated with reduced adhesion molecule gene and protein expression in sickle red cells with a concomitant reduction in adhesive properties. *Eur J Haematology* 2007; 78: 144-51.
- Garrido VT, Proença-Ferreira R, Dominical VM, Traina F, Bezerra MA, de Mello MR, Colella MP, Araújo AS, Saad ST, Costa FF, Conran N. Elevated plasma levels and platelet-associated expression of the pro-thrombotic and pro-inflammatory protein, TNFSF14 (LIGHT), in sickle cell disease. *Br J Haematol*. 2012 Sep;158(6):788-97.
- Gauchat JF, Henchoz S, Fattah D, Mazzei G, Aubry JP, Jomotte T, et al. CD40 ligand is functionally expressed on human eosinophils. *Eur J Immunol* 1995;25:863--5.

- Gawaz M, Neumann FJ, Dickfeld T, et al. Activated platelets induce monocyte chemotactic protein-1 secretion and surface expression of intercellular adhesion molecule-1 on endothelial cells. *Circulation*. 1998;98:1164-1171.
- Graf D, Korthauer GD, Mages HW, Senger G, Kroczeck RA. Cloning of TRAP, a ligand for CD40 on human T cells. *Eur J Immunol* 1992;22:3191--4.
- Granger SW, Butrovich KD, Houshmand P, Edwards WR, Ware CF. Genomic characterization of LIGHT reveals linkage to an immune response locus on chromosome 19p13.3 and distinct isoforms generated by alternate splicing or proteolysis. *J Immunol*. 2001 Nov 1;167(9):5122-8.
- Granger SW, Rickert S. LIGHT–HVEM signaling and the regulation of T cell-mediated immunity. *Cytokine Growth Factor Rev* 2003;14: 289–96.
- Guyton AC, Hall JE. *Tratado de Fisiologia Médica*; tradução Patrícia Lydie Voeux. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002.
- Hagar W, Vichinsk E. Advances in clinical research in sickle cell disease. *British Journal of Haematology* 2008; 141: 346–356.
- Hassell KL. Pulmonary hypertension, tricuspid regurgitant velocity screening, and the nitric oxide pathway. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2011;2011:419-26.
- Hebbel RP, Osarogiagbon R, Kaul D. The endothelial biology of sickle cell disease: inflammation and a chronic vasculopathy. *Microcirculation*. 2004 Mar;11(2):129-51.
- Henn V, Slupsky JR, Grafe M, et al. CD40 ligand on activated platelets triggers an inflammatory reaction of endothelial cells. *Nature*. 1998; 391: 591–594.
- Heo SK, Ju SA, Lee SC, Park SM, Choe SY, Kwon B, Kwon BS, Kim BS. LIGHT enhances the bactericidal activity of human monocytes and neutrophils via HVEM. *Journal of Leukocyte Biology* 2006; 79; 330-338.
- Jin Y, Nonoyama S, Morio T, Imai K, Ochs HD, Mizutani S. Characterization of soluble CD40 ligand released from human activated platelets. *J Med Dent Sci*. 2001 Mar; 48(1):23-7.

- Kang YM, Kim SY, Kang JH, Han SW, Nam EJ, Kyung HS, Park JY, Kim IS. LIGHT up-regulated on B lymphocytes and monocytes in rheumatoid arthritis mediates cellular adhesion and metalloproteinase production by synoviocytes. *Arthritis Rheum.* 2007; 56(4): 1106-17.
- Kim WJ, Kang YJ, Koh EM, Ahn KS, Cha HS, Lee WH. LIGHT is involved in the pathogenesis of rheumatoid arthritis by inducing the expression of pro-inflammatory cytokines and MMP-9 in macrophages. *Immunology.* 2005 Feb;114(2):272-9.
- Kleemann R, et al. Cytokines and atherosclerosis: a comprehensive review of studies in mice. *Cardiovasc Res* 2008; 79: 360–376.
- Klinger MH, Jelkmann W. Role of blood platelets in infection and inflammation. *J Interferon Cytokine Res.* 2002;22:913-922.
- Kuckleburg CJ, Yates CM, Kalia N, Zhao Y, Nash GB, Watson SP, Rainger GE. Endothelial cell-borne platelet bridges selectively recruit monocytes in human and mouse models of vascular inflammation. *Cardiovasc Res.* 2011 Jul 1;91(1):134-41.
- Lanaro C, Franco-Penteado CF, Albuquerque DM, Saad STO, Conran N, Costa FF. Altered levels of cytokines and inflammatory mediators in plasma and leukocytes of sickle cell anemia patients and effects of hydroxyurea therapy. *Journal of Leukocyte Biology.* 2009; 85:235-242.
- Lankron S, Stouse JJ, Wilson R, et al. Systematic review: hydroxyurea for the treatment of adults with sickle cell disease. *Ann Intern Med* 2008; 48: 939–55.
- Lee SP, Ataga KI, Orringer EP, Phillips DR, Parise LV. Biologically active CD40 ligand is elevated in sickle cell anemia: potential role for platelet-mediated inflammation. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology.* 2006; 26:1626–1631.
- Lee WH, Kim SH, Lee Y, Lee BB, Kwon B, Song H, Kwon BS, Park JE. Tumor necrosis factor receptor superfamily 14 is involved in atherogenesis by inducing proinflammatory cytokines and matrix metalloproteinases. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2001 Dec;21(12):2004-10.

- Lievens D, Eijgelaar WJ, Biessen EA, Daemen MJ, Lutgens E. The multi-functionality of CD40L and its receptor CD40 in atherosclerosis. *Thromb Haemost.* 2009 Aug;102(2):206-14.
- Lievens D, Zerneck A, Seijkens T, Soehnlein O, Beckers L, Munnix IC, Wijnands E, Goossens P, van Kruchten R, Thevissen L, Boon L, Flavell RA, Noelle RJ, Gerdes N, Biessen EA, Daemen MJ, Heemskerk JW, Weber C, Lutgens E. Platelet CD40L mediates thrombotic and inflammatory processes in atherosclerosis. *Blood.* 2010 Nov 18;116(20):4317-27.
- Lin WW, Hsieh SL. Decoy receptor 3: a pleiotropic immunomodulator and biomarker for inflammatory diseases, autoimmune diseases and cancer. *Biochem Pharmacol.* 2011; 1;81(7):838-47.
- Liu GZ, Fang LB, Hjelmstrom P, Gao XG. Enhanced plasma levels of LIGHT in patients with acute atherothrombotic stroke. *Acta Neurol Scand.* 2008 Oct;118(4):256-9.
- Lou TF, Singh M, Mackie A, Li W, Pace BS. Hydroxyurea generates nitric oxide in human erythroid cells: mechanisms for gamma-globin gene activation. *Exp Biol Med* 2009; 234: 1374–82.
- Mauri DN, Ebner R, Montgomery RI, Kochel KD, Cheung TC, Yu GL, Ruben S, Murphy M, Eisenberg RJ, Cohen GH, Spear PG, Ware CF. LIGHT, a new member of the TNF superfamily, and lymphotoxin alpha are ligands for herpesvirus entry mediator. *Immunity.* 1998 Jan;8(1):21-30.
- Mekontso Dessap A, Deux JF, Abidi N, Lavenu-Bombled C, Melica G, Renaud B, et al. Pulmonary artery thrombosis during acute chest syndrome in sickle cell disease. *Am J Respir Crit Care Med.* 2011;184(9):1022-9.
- Morel Y, Schiano de Colella JM, Harrop J, Deen KC, Holmes SD, Wattam TA, Khandekar SS, Truneh A, Sweet RW, Gastaut JA, Olive D, Costello RT. Reciprocal expression of the TNF family receptor herpes virus entry mediator and its ligand LIGHT on activated T cells: LIGHT down-regulates its own receptor. *J Immunol.* 2000 Oct 15;165(8):4397-404.

- Nagel RL, Fabry ME, Steinberg MH. The paradox of hemoglobin SC disease. *Blood Reviews*. 2003;17:167-178.
- Noguchi CT, Rodgers GP, Serjeant G, Schechter AN. Levels of fetal hemoglobin necessary for treatment of sickle cell disease. *N Engl J Med* 1988; 318: 96–99.
- Novelli EM, Kato GJ, Ragni MV, Zhang Y, Hildesheim ME, Nouraie M, Barge S, Meyer MP, Hassett AC, Gordeuk VR, Gladwin MT, Isenberg JS. Plasma thrombospondin-1 is increased during acute sickle cell vaso-occlusive events and associated with acute chest syndrome, hydroxyurea therapy, and lower hemolytic rates. *Am J Hematol*. 2012 Mar;87(3):326-30.
- Odièvre MH, Brun M, Krishnamoorthy R, Lapoumériou C, Elion J. Sodium Phenyl Butyrate downregulates endothelin-1 expression in cultured human endothelial cells: Relevance to Sickle-cell disease. *Am J Hematol* 2007; 82: 357-362.
- Osarogiagbon UR, Choong S, Belcher JD, et al. Reperfusion injury pathophysiology in sickle transgenic mice. *Blood* 2000; 96:314–320.
- Ott I, Neumann FJ, Gawaz M, Schmitt M, Schomig A. Increased neutrophil-platelet adhesion in patients with unstable angina. *Circulation*. 1996;94:1239 –1246.
- Otterdal K, Pedersen TM, Solum NO. Release of soluble CD40 ligand after platelet activation. Studies on the solubilization phase. *Thromb Res*. 2004;114:167-177.
- Otterdal K, Smith C, Oie E, et al. Platelet-derived LIGHT induces inflammatory responses in endothelial cells and monocytes. *Blood* 2006; 108: 928-935.
- Platt OS, Brambilla DJ, Rosse WF, Milner PF, Castro O, Steinberg MH, Klug PP. Mortality in sickle cell disease. Life expectancy and risk factors for early death. *N Engl J Med*. 1994 Jun 9;330(23):1639-44.
- Platt OS, Orkin SH, Dover G, Beardsley GP, Miller B, Nathan DG. Hydroxyurea enhances fetal hemoglobin production in sickle cell anaemia. *J Clin Invest* 1984; 74: 652–56.
- Polanowska-Grabowska R, Wallace K, Field JJ, Chen L, Marshall MA, Figler R, Gear AR, Linden J. P-selectin-mediated platelet-neutrophil aggregate formation activates

- neutrophils in mouse and human sickle cell disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2010 Dec;30(12):2392-9.
- Proença-Ferreira R, Brugnerotto AF, Garrido VT, Dominical VM, Vital DM, Ribeiro MFR, Santos ME, Traina F, Saad STO, Costa FF, Conran N. Endothelial Activation by Platelets from Sickle Cell Anemia Patients. *PLoS One*. No prelo, 2014.
- Proença-Ferreira R, Franco-Penteado CF, Traina F, Saad STO, Costa FF, Conran N. Increased adhesive properties of platelets in sickle cell disease: roles for $\alpha_{IIb}\beta_3$ -mediated ligand binding, diminished cAMP signalling and increased phosphodiesterase 3A activity. *Br J Haematol.* 2010;149:280–288.
- Rahman M, Zhang S, Chew M, Ersson A, Jeppsson B, Thorlacius H. Platelet-Derived CD40L (CD154) Mediates Neutrophil Upregulation of Mac-1 and Recruitment in Septic Lung Injury. *Ann Surg* 2009;250: 783–790.
- Rees DC, Williams TN, Gladwin MT. Sickle-cell disease. *Lancet.* 2010;376: 2018–31.
- Reiter CD, Wang X, Tanus-Santos JE, et al. Cell-free hemoglobin limits nitric oxide bioavailability in sickle-cell disease. *Nat Med.* 2002; 8: 1383–89.
- Rooney IA, Butrovich KD, Glass AA, Borboroglu S, Benedict CA, Whitbeck JC, Cohen GH, Eisenberg RJ, Ware CF. The lymphotoxin- beta receptor is necessary and sufficient for LIGHT-mediated apoptosis of tumor cells. *J Biol Chem.* 2000 May 12;275(19):14307-15.
- Saleh AW, Duits AJ, Gerbers A, de Vries C, Hillen HF. Cytokines and soluble adhesion molecules in sickle cell anemia patients during hydroxyurea therapy. *Acta Haematol.* 1998;100(1):26-31.
- Sandberg WJ, Halvorsen B, Yndestad A, Smith C, Otterdal K, Brosstad FR, Frøland SS, Olofsson PS, Damås JK, Gullestad L, Hansson GK, Oie E, Aukrust P. Inflammatory interaction between LIGHT and proteinase-activated receptor-2 in endothelial cells: potential role in atherogenesis. *Circ Res.* 2009 Jan 2;104(1):60-8.
- Schneider K, Potter KG, Ware CF. Lymphotoxin and LIGHT signaling pathways and target genes. *Immunol Rev.* 2004 Dec;202:49-66.

- Schonbeck U, Libby P. CD40 signaling and plaque instability. *Circ Res* 2001; 89: 1092–1103.
- Schonbeck U, Libby P. The CD40/CD154 receptor/ligand dyad. *Cell Mol Life Sci* 2001. 58, 4–43.
- Schonbeck U, Sukhova GK, Shimizu K, Mach F, Libby P, Inhibition of CD40 signaling limits evolution of established atherosclerosis in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97, 7458–7463.
- Setty BN, Betal SG, Zhang J, Stuart MJ. Heme induces endothelial tissue factor expression: potential role in hemostatic activation in patients with hemolytic anemia. *J Thromb Haemost* 2008;6:2202–9.
- Solovey A, Gui L, Key NS, Hebbel RP. Tissue factor expression endothelial cells in sickle cell anemia. *J Clin Invest* 1998; 101: 1899–904.
- Solovey A, Lin Y, Browne P, Choong S, Wayner E, Hebbel RP. Circulating activated endothelial cells in sickle cell anemia. *N Engl J Med* 1997; 337: 1584-1590.
- Sowemimo-Coker SO, Meiselman HJ, Francis RB Jr. Increased circulating endothelial cells in sickle cell crises. *Am J Hematol* 1989; 31: 263–65.
- Spriggs MK, Armitage RJ, Strockine L, Clifford KN, Macduff BM, Sato TA, et al. Recombinant human CD40 ligand stimulates B cell proliferation and immunoglobulin E secretion. *J Exp Med* 1992;176:1543--50.
- Srivastava R, Srimal RC. Amplification of platelet response during acute inflammation in rats. *Biochem Pharmacol.* 1990;40:357-363.
- Stout RD, Suttles J. The many roles of CD40 in cell-mediated inflammatory responses. *Immunol Today.* 1996;17:487-492.
- Stuart MJ, Nagel RL. Sickle-cell disease. *Lancet* 2004; 364: 1343-60.
- Sugihara K, Sugihara T, Mohandas N, et al. Thrombospondin mediates adherence of CD36+ sickle reticulocytes to endothelial cells. *Blood.* 1992; 80:2634–2642.
- Tamada K, Shimozaki K, Chapoval AI, Zhai Y, Su J, Chen SF, Hsieh SL, Nagata S, Ni J, Chen L. LIGHT, a TNF-like molecule, costimulates T cell proliferation and is required

- for dendritic cell-mediated allogeneic T cell response. *J Immunol.* 2000 15;164(8):4105-10.
- Tedgui A, Mallat Z. Cytokines in atherosclerosis: pathogenic and regulatory pathways. *Physiol Rev* 2006; 86: 515–581.
- Turhan A, Weiss LA, Mohandas N, Collier BS, Frenette PS. Primary role for adherent leukocytes in sickle cell vascular occlusion: a new paradigm. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99: 3047–51.
- Urbich C, et al. CD40 ligand inhibits endothelial cell migration by increasing production of endothelial reactive oxygen species. *Circulation* 2002; 106: 981–986.
- van Kooten C, Banchereau J. CD40-- ligand. *J Leukoc Biol* 2000;67:2
- Vichinsky EP, Neumayr LD, Earles AN, Williams R, Lennette ET, Dean D, et al. Causes and Outcomes of the Acute Chest Syndrome in Sickle Cell Disease. *N Engl J Med.* 2000;342(25):1855-65.
- Viemann D, Goebeler M, Schmid S, et al. TNF induces distinct gene expression programs in microvascular and macrovascular human endothelial cells. *J Leukoc Biol.* 2006; 80:174–185.
- Villagra J, Shiva S, Hunter LA, Machado R.F, Gladwin MT, Kato GJ. Platelet Activation in Patients with Sickle Disease, Hemolysis-Associated Pulmonary Hypertension and Nitric Oxide Scavenging by Cell-Free Hemoglobin. *Blood* 2007; 110: 2166-72.
- Wang J, Fu YX. Tumor necrosis factor family members and inflammatory bowel disease. *Immunol Rev* 2005;204:144–55.
- Ware CF. Targeting lymphocyte activation through the lymphotoxin and LIGHT pathways. *Immunol Rev* 2008;223:186–201.
- Ware CF. Targeting the LIGHT-HVEM pathway. *Adv Exp Med Biol.* 2009;647:146-55.
- Weber C, Belge KU, von Hundelshausen P, Draude G, Steppich B, et al. Differential chemokine receptor expression and function in human monocyte subpopulations. *J Leukoc Biol.* 2000 67(5): 699–704.

- Wilson MS, Wynn TA. Pulmonary fibrosis: pathogenesis, etiology and regulation. *Mucosal Immunol.* 2009; 2:103–121
- Wun T, Cordoba M, Rangaswami A, Cheung AW, Paglieroni T. Activated monocytes and platelet-monocyte aggregates in patients with sickle cell disease. *Clin Lab Haematol.* 2002;24:81– 88.
- Xu Y, Zhang C, Wang N, Ling F, Li P, Gao Y, Hua W. Adiponectin inhibits lymphotoxin- β receptor-mediated NF- κ B signaling in human umbilical vein endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2011 Jan 28;404(4):1060-4.
- Zernecke A, et al. Chemokines in Atherosclerosis. An Update. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2008; 28:1897-1908.
- Zhai Y, Guo R, Hsu TL, Yu GL, Ni J, Kwon BS, et al. LIGHT, a novel ligand for lymphotoxin beta receptor and TR2/HVEM induces apoptosis and suppresses in vivo tumor formation via gene transfer. *J Clin Invest.* 1998 Sep 15;102(6):1142-51.
- Ziegler SF, Ramsdell F, Alderson MR. The activation antigen CD69. *Stem Cells.* 1994 Sep;12(5):456-65.

ANEXOS

ANEXO I - Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa da FCM/UNICAMP



FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

www.fcm.unicamp.br/pesquisa/etica/index.html

CEP, 24/03/09.
(Grupo III)

PARECER CEP: Nº 065/2009 (Este nº deve ser citado nas correspondências referente a este projeto)
CAAE: 0049.0.146.000-09

I - IDENTIFICAÇÃO:

PROJETO: “LIBERAÇÃO E EXPRESSÃO DE MEDIADORES INFLAMATÓRIOS POR PLAQUETAS DE INDIVÍDUOS SAUDÁVEIS, PACIENTES COM ANEMIA FALCIFORME E PACIENTES COM DISFUNÇÃO ENDOTELIAL E/OU ATROSCLEROSE”.

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Vanessa Tonin Garrido

INSTITUIÇÃO: Hemocentro/UNICAMP

APRESENTAÇÃO AO CEP: 09/02/2009

APRESENTAR RELATÓRIO EM: 24/03/10 (O formulário encontra-se no *site* acima)

II - OBJETIVOS

Investigar a produção de TSP-1, PF4, RANTES, IL-1beta, IL-8, sCD40L e sLIGHT) em plaquetas e a presença dos mesmos no plasma de pacientes com AF, pacientes com disfunção endotelial e/ou aterosclerose e comparar estes dados com os de indivíduos saudáveis. Analisar a expressão de CD40L e LIGHT na superfície das plaquetas dos indivíduos envolvidos e a determinação da presença de RNA mensageiro para PF4, RANTES, IL-1beta, IL-8, CD40L e LIGHT nessas plaquetas.

III - SUMÁRIO

Pretende-se avaliar 5 grupos de 10 indivíduos, com idades entre 18 e 50 anos: controles, pacientes com AF, pacientes com AF em tratamento com hidroxiuréia (HU), pacientes com disfunção endotelial, e pacientes com AVC aterosclerótico de grandes artérias. Serão colhidas amostras de sangue destes indivíduos - dos pacientes, dentro do procedimento padrão de exame de sangue (será colhido um pouco mais de sangue), e dos controles, quando forem doar sangue (pois os controles serão escolhidos entre doadores). Alguns (6) pacientes com AF também farão um exame de avaliação de disfunção endotelial.

IV - COMENTÁRIOS DOS RELATORES

Projeto de mestrado. O protocolo está excelente, seguindo exatamente o modelo do CEP. Os critérios de inclusão e exclusão estão claros, a seção de aspectos éticos explica exatamente os procedimentos aos quais os sujeitos serão submetidos, e a pesquisadora fez 3 Termos de Consentimento Livre e Esclarecido, um para controles, um para pacientes com AF ou hipertensão nos quais será realizado o exame de avaliação de disfunção endotelial, e outro para pacientes com AF ou AVC que serão sujeitos apenas ao exame de sangue. A pesquisa será financiada pela FAPESP.

Recomendamos que a Folha de Rosto/CONEP tenha a assinada do responsável do Hemocentro e não co-orientador.

Comitê de Ética em Pesquisa - UNICAMP
Rua: Tessália Vieira de Camargo, 126
Caixa Postal 6111
13083-887 Campinas - SP

FONE (019) 3521-8936
FAX (019) 3521-7187
cep@fcm.unicamp.br



V - PARECER DO CEP

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, após acatar os pareceres dos membros-relatores previamente designados para o presente caso e atendendo todos os dispositivos das Resoluções 196/96 e complementares, resolve aprovar sem restrições o Protocolo de Pesquisa, bem como ter aprovado o Termo do Consentimento Livre e Esclarecido, assim como todos os anexos incluídos na Pesquisa supracitada.

O conteúdo e as conclusões aqui apresentados são de responsabilidade exclusiva do CEP/FCM/UNICAMP e não representam a opinião da Universidade Estadual de Campinas nem a comprometem.

VI - INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES

O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (Res. CNS 196/96 – Item IV.1.f) e deve receber uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado (Item IV.2.d).

Pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou (Res. CNS Item III.1.z), exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade do regime oferecido a um dos grupos de pesquisa (Item V.3.).

O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Res. CNS Item V.4.). É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.

Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Em caso de projeto do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma junto com o parecer aprovatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial (Res. 251/97, Item III.2.e)

Relatórios parciais e final devem ser apresentados ao CEP, de acordo com os prazos estabelecidos na Resolução CNS-MS 196/96.

VII - DATA DA REUNIÃO

Homologado na III Reunião Ordinária do CEP/FCM, em 24 de março de 2009.


Prof.ª Dra. Carmen Sílvia Bertuzzo
PRESIDENTE DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
FCM / UNICAMP

APÊNDICE

Elevated plasma levels and platelet-associated expression of the pro-thrombotic and pro-inflammatory protein, TNFSF14 (LIGHT), in sickle cell disease

Vanessa T. Garrido,¹ Renata Proença-Ferreira,¹ Venina M. Dominical,¹ Fabiola Traina,¹ Marcos A. C. Bezerra,² Mariana R. B. de Mello,¹ Marina P. Colella,¹ Aderson S. Araújo,³ Sara T. O. Saad,¹ Fernando F. Costa¹ and Nicola Conran¹

¹INCT de Sangue, Haematology and Haemotherapy Centre, School of Medicine, University of Campinas – UNICAMP, Campinas, SP, ²Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, and ³Haematology and Haemotherapy Foundation of Pernambuco (HEMOPE), Recife, PE, Brazil

Received 23 February 2012; accepted for publication 28 May 2012

Correspondence: Nicola Conran, Hemocentro, Rua Carlos Chagas 480, Cidade Universitária, UNICAMP, Campinas, SP 13083-970, Brazil. E-mail: conran@unicamp.br

Summary

Chronic vascular inflammation and endothelial activation may initiate vaso-occlusion in sickle cell disease (SCD). TNFSF14 (CD258; LIGHT), a recently-identified pro-thrombotic and pro-inflammatory tumour necrosis factor (TNF)-superfamily cytokine, has a potent activating effect on endothelial cells. We evaluated whether TNFSF14 production is altered in SCD and whether platelets contribute to this production. TNFSF14 was measured in platelet-free plasma from healthy-control individuals (CON), steady-state sickle cell anaemia (SCA), SCA on hydroxycarbamide therapy (SCAHC) and haemoglobin SC (HbSC) patients. Mean plasma TNFSF14 was significantly increased in SCA, SCAHC and HbSC, compared to CON individuals. In SCA/SCAHC patients, plasma TNFSF14 showed no correlation with haematological variables, but was significantly correlated with serum lactate dehydrogenase and inflammatory markers (CD40LG, IL8 and ICAM1). Platelet-membrane TNFSF14 expression was significantly augmented on SCA platelets, and correlated with platelet activation; furthermore, measurement of platelet TNFSF14 release indicated that platelets may be a major source of circulating TNFSF14 in SCA. Interestingly, high plasma TNFSF14 was significantly associated with elevated tricuspid regurgitant velocity (≥ 2.5 m/s) in a population of SCA/SCAHC patients. The pro-inflammatory and atherogenic cytokine, TNFSF14, could contribute to endothelial activation and inflammation in SCA; future investigations may confirm whether this protein contributes to major clinical complications of the disease, such as pulmonary hypertension, and represents a potential therapeutic target.

Keywords: sickle cell disease, inflammation, platelets, endothelium, vaso-occlusion.

The pathogenesis of sickle cell disease (SCD) derives primarily from the polymerization of deoxygenated haemoglobin S in red blood cells, leading to their adoption of a sickle shape and reduced deformability (Stuart & Nagel, 2004). Sickle cell vaso-occlusion results from the interaction of activated leucocytes, heterocellular aggregates and red blood cells with the vascular endothelium, leading to tissue infarction and perpetuation of vascular inflammation (Frenette, 2004; Stuart & Nagel, 2004). SCD individuals demonstrate increased levels of numerous pro-inflammatory proteins in their circulation, and ensuing vascular inflammation may play a fundamental role in the activation of endothelial cells and leucocytes

(Graido-Gonzalez *et al*, 1998; Conran & Costa, 2009; Lanaro *et al*, 2009). Elevated cytokines and pro-inflammatory proteins, identified in some populations of SCD individuals, include interleukin 8 (IL8), tumour necrosis factor (TNF)- α , C-reactive protein (CRP), IL6 and soluble adhesion molecules (Croizat, 1994; Duits *et al*, 1996; Conran *et al*, 2004; Hibbert *et al*, 2005; Lanaro *et al*, 2009). Multiple cell types contribute to the production of inflammatory mediators, including activated endothelial cells, leucocytes and platelets. Furthermore, interactions of platelets with monocytes (Wun *et al*, 2002), erythrocytes (Wun *et al*, 2002) and neutrophils (Polanowska-Grabowska *et al*, 2010) are thought to promote

First published online 6 July 2012
doi: 10.1111/j.1365-2141.2012.09218.x

© 2012 Blackwell Publishing Ltd
British Journal of Haematology, 2012, **158**, 788–797

the activation of these cells and the formation of aggregates in SCD. Several platelet-derived cytokines may contribute to vascular inflammation in SCD (Klinger & Jelkmann, 2002); for example, platelet-associated CD40 ligand (CD40LG), a ligand for the CD40 TNF receptor superfamily protein, has a significant inflammatory and activating effect on endothelial cells (Henn *et al*, 1998). The soluble form of CD40LG (sCD40LG) has been found to be elevated and biologically active in individuals with sickle cell anaemia (SCA), suggesting a potential contribution of platelet-derived mediators to the chronic inflammation and to the increased thrombotic activity known to occur in the disease (Lee *et al*, 2006).

TNFSF14 (CD258; LIGHT; Lymphotoxin-like, exhibits inducible expression, and competes with HSV glycoprotein D (gD) for TNFRSF14 [HVEM], a receptor expressed by T lymphocytes) is a type 2 transmembrane protein, also belonging to the TNF superfamily (Mauri *et al*, 1998), which is involved in the innate and adaptive immune response, as well as in the regulation of cell survival and proliferation. This inflammatory protein binds to three distinct members of the TNF receptor family, TNFRSF14, the lymphotoxin- β receptor (LTBR), and TNFRSF6B (DcR3) (Granger & Rickert, 2003). TNFSF14 is known to be expressed and produced by activated T cells, monocytes and granulocytes, as well as platelets, and is released in soluble form upon cell activation (Granger & Rickert, 2003). Moreover, studies (Chang *et al*, 2005; Celik *et al*, 2007, 2009) have reported the involvement of platelet-associated TNFSF14 in the adhesion of platelets to endothelium. Studies also suggest that TNFSF14 can induce an inflammatory response in endothelial cells via upregulation of ICAM1, VCAM1 and IL8 production and expression (Otterdal *et al*, 2006), and in monocytes through upregulation of CCL2 (MCP-1) and IL8 (Otterdal *et al*, 2006). TNFSF14 is thought to contribute to inflammation in rheumatoid arthritis (Kim *et al*, 2005), hepatitis (Anand *et al*, 2006) and atherogenesis (Lee *et al*, 2001), and has been suggested as a potential therapeutic target in atherosclerosis (Sandberg *et al*, 2009), where it plays a pro-thrombotic and pro-inflammatory role (Aukrust *et al*, 2011). The present study evaluated whether production of TNFSF14 is altered in patients with SCD, and the participation that platelets may have in this production, given that SCD is noted for a significant chronic inflammation and endothelial activation that may initiate the vaso-occlusive process. Finally, associations between high levels of TNFSF14 production and clinical manifestations of SCD were observed.

Patients and methods

Patients

Patients that were homozygous for haemoglobin S (HbSS) or with haemoglobin SC (HbSC) disease were recruited, during steady state, for the study from the Haemoglobinopathies Clinics of the University of Campinas and the

Fundação Hemope, Recife, Brazil. None of the patients were in crisis, they had not received blood transfusions in the preceding 2 months and had not taken aspirin during the previous 10 d. Patients on hydroxycarbamide (HC) therapy had been taking 20–30 mg/kg/d for at least 3 months. The clinical indications for treatment with HC were, generally, frequent painful crises, acute chest syndrome, stroke and/or severe haemolytic anaemia. Homozygous haemoglobin A (HbAA) healthy controls were age- and gender-matched, as appropriate. Informed written consent was obtained from all patients and controls and the study was approved by the Ethics Committees of the University of Campinas and Fundação Hemope, Pernambuco. Clinical data for each patient from the Campinas cohort were reviewed at the time of sample collection. Incidences of a single or multiple episodes of stroke (diagnosed clinically and radiographically), osteonecrosis (as demonstrated by radiographic images), leg ulcer, priapism, acute chest syndrome (diagnosed clinically and radiographically) and/or elevated tricuspid regurgitant velocity (TRV) (≥ 2.5 m/s, according to echocardiograms available for 41 patients from the Campinas cohort) were recorded. Patients' clinical characteristics are described in Table I.

Isolation and stimulation of platelets

Whole blood (collected in acid-citrate-dextrose) was centrifuged (200 g, 20°C, 15 min) to obtain platelet-rich plasma (PRP). PRP was washed once in wash buffer (140 mmol/l NaCl, 5.0 mmol/l KCl, 12 mmol/l sodium citrate, 10 mmol/l glucose and 12.5 mmol/l sucrose, pH 6) and platelets were pelleted by centrifugation at 800 g at 20°C for 12 min. The platelet pellet was resuspended in O₂/CO₂ gassed Krebs solution (118 mmol/l NaCl, 25 mmol/l NaHCO₃, 1.2 mmol/l KH₂PO₄, 1.7 mmol/l MgSO₄, 5.6 mmol/l glucose, pH 7.4), and platelets counted using a Cell Dyn apparatus (Cell-Dyn[®] 1600; Mountain View, CA, USA) and adjusted to a concentration of $2 \cdot 10^8$ platelets/ml in Krebs buffer. When stimulated, washed platelets were incubated with 20 μ mol/l ADP or 10 μ g/ml human collagen type I (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) at 37°C for 90 min and supernatants were stored at –80°C until analyses.

Flow cytometry

Expression of proteins on the platelet surface was measured by flow cytometry. Unwashed PRP (5 μ l) was stimulated, or not, with 20 μ mol/l ADP (Sigma-Aldrich) for 30 min at room temperature, fixed (1% paraformaldehyde, 10 min, room temperature) and stained with phycoerythrin (PE)-conjugated anti-TNFSF14 (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA), PE-conjugated anti-LTBR (R&D Systems), allophycocyanin (APC)-conjugated anti-TNFRSF14 (R&D Systems), fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated anti-CD62P (anti-P-selectin; Becton Dickinson, San Jose,

Table 1. Clinical details of patients participating in the study.

	SCA	SCAHC	HbSC
Male/female	26/31	26/20	8/14
Age (years)	32.4 (31, 15, 59)	33.2 (30, 17, 58) <i>P</i> > 0.05	43 (43, 22, 65)
Red blood cell count ($10^{12}/l$)	2.7 (2.8, 1.7, 4.3)	2.4 (2.3, 1.5, 3.6) <i>P</i> = 0.01	4.3 (4.2, 2.4, 6.3)
Haematocrit (%)	24.4 (23.8, 16.0, 34.9)	25.9 (25.9, 18.7, 36.4) <i>P</i> = 0.05	33.5 (32.7, 23.8, 47.4)
Haemoglobin (g/l)	8.2 (7.9, 5.5, 11.8)	8.8 (8.7, 6.2, 11.7) <i>P</i> = 0.03	11.6 (11.3, 8.1, 15.7)
Mean corpuscular volume (fl)	89.9 (88.5, 71.1, 112.8)	107.5 (109.6, 73.1, 134.0) <i>P</i> < 0.0001	80.4 (76.7, 58.7, 113.9)
Mean corpuscular haemoglobin (pg)	30.1 (30.3, 22.5, 35.9)	36.2 (36.8, 24.1, 44.8) <i>P</i> < 0.0001	28.2 (27.3, 18.2, 42.1)
White blood cell count ($10^9/l$)	11.8 (11.0, 6.1, 29.6)	9.3 (9.1, 3.8, 15.0) <i>P</i> = 0.002	9.2 (8.4, 3.9, 15.3)
Platelet count ($10^9/l$)	383.7 (365.0, 163.0, 698.0)	350.6 (327.0, 108.0, 780.0) <i>P</i> > 0.05	306.7 (252.0, 88.5, 625.7)
HbF (%)	6.0 (5.8, 0.4, 21.5)	11.4 (11.1, 1.1, 29.3) <i>P</i> < 0.0001	1.1 (1.8, 0.3, 12.2)

Except for sex, all data represent the mean (median, minimum, maximum) values for steady-state sickle cell anaemia (SCA), SCA patients on HC therapy (SCAHC; 20–30 mg/kg/d) and haemoglobin SC individuals (HbSC). HbF, fetal haemoglobin. *P*-values compare SCAHC group with SCA group.

CA, USA), FITC-PAC-1 antibody (anti-activated $\alpha_{IIb}\beta_3$ integrin, Becton Dickinson) and/or control antibody (non-specific mouse IgG1, Becton Dickinson). Samples were then washed once again in phosphate-buffered saline and platelet fluorescence (10 000 events) was analysed. All analyses were performed with a FACScalibur (Becton Dickinson) using FACS DIVA software (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA).

Inflammatory marker measurement

Levels of TNFSF14, sCD40LG, IL8, TNFRSF6B, sICAM1 and sVCAM1 were determined in the supernatants of stimulated and unstimulated platelets ($2 \times 10^8/ml$ in Kreb's buffer) or platelet-free plasma (PFP) using high-sensitivity enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA), according to the manufacturer's instructions (R&D Systems).

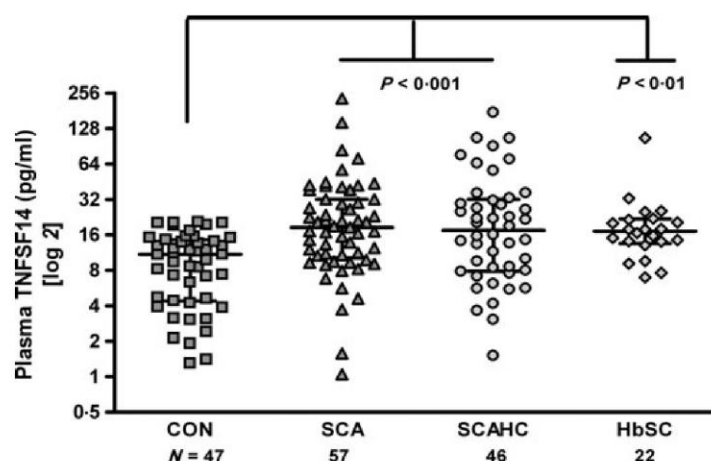


Fig 1. Plasma TNFSF14 concentrations (logarithmic scale) in healthy-control individuals (CON; HbAA), steady-state SCA, steady-state SCA patients on hydroxycarbamide (20–30 mg/kg/d; SCAHC) and haemoglobin SC (HbSC) patients. Plasma TNFSF14 was determined in platelet-free plasma by ELISA.

Statistical analyses

Data are reported as the mean and standard error of the mean or median and interquartile range of n subjects. Comparisons between different patient groups were performed using non-parametric analysis of variance (Kruskal Wallis comparison) followed by Dunn's Multiple Comparisons test. Correlations were analysed using the Spearman's test for non-Gaussian distributions. Fisher's exact test was used to compare the incidence of clinical complications in patient groups. Differences were considered to be significant when $P < 0.05$.

Results

Plasma levels of TNFSF14 are significantly elevated in SCA patients

TNFSF14 levels were measured by ELISA in PFP from healthy control individuals (CON; HbAA), SCA patients, SCAHC patients and HbSC patients. Mean, median and interquartile ranges were 10.5 (10.9; 4.4; 14.5) pg/ml; 28.0 (18.5; 10.2; 32.1) pg/ml; 29.2 (17.5; 7.9; 31.6) pg/ml; 21.1 (17.2; 13.5; 21.8) pg/ml for CON, SCA, SCAHC and HbSC, respectively (Fig 1). While TNFSF14 levels were significantly higher in SCA and SCAHC individuals than in control individuals, intermediate levels of circulating TNFSF14 ($P < 0.01$, compared to CON) were observed in HbSC disease individuals, a population that produces HbS but demonstrates decreased platelet and leucocyte counts and haemolysis, when compared with SCA individuals (See Table I). No significant correlations were found between plasma TNFSF14 and platelet counts, leucocyte counts or HbF levels in SCA individuals (Table II); although a positive correlation was found between leucocyte counts and TNFSF14 in SCAHC patients. In contrast, in HbSC individuals, a positive correlation was found between plasma TNFSF14 and platelet counts (Table II). Twelve out of 57 SCA and 6/46 SCAHC individuals displayed concurrent α -thalas-

saemic trait; however, no statistical influence of α -thalassaemic trait on TNFSF14 levels was detected ($P > 0.05$, comparing TNFSF14 levels for α - and non- α -thalassaemic trait).

Plasma levels of TNFSF14 correlate with other inflammatory cytokines and markers of vasculopathy in the plasma of SCA patients

Plasma TNFSF14 levels in both SCA and SCAHC patients showed extremely significant correlation with plasma levels of sCD40LG, another important platelet-derived inflammatory protein (Table III). TNFSF14 also significantly correlated with plasma levels of IL8, an inflammatory mediator produced by endothelial cells, amongst other cell types (Table III), in both SCA and SCAHC patients. A positive correlation was also found between TNFSF14 and plasma sICAM1 (an adhesion molecule released by activated endothelium) in SCA patients, but no correlation was found between TNFSF14 and plasma sVCAM1 (Table III).

SCA platelets express increased surface TNFSF14

Flow cytometry demonstrated that the expression of TNFSF14 protein (CD258) was significantly higher on the surface of platelets of SCA and SCAHC individuals, compared to platelets from healthy control individuals (CON PLTs) (Fig 2A). Notably, when platelets were activated by incubation with ADP, platelets from SCA and SCAHC individuals still expressed significantly more surface TNFSF14 than activated CON PLTs (Fig 2B).

TNFSF14 expression on both non-stimulated and ADP-activated platelets from SCA individuals correlated significantly with PAC-1 binding (an antibody that binds to activated $\alpha_{IIb}\beta$ integrin) (Fig 2C, D), while ADP-activated SCA platelet surface TNFSF14 expression correlated with P-selectin expression, another marker of platelet activation (Fig 2E).

Table II. Correlation of plasma TNFSF14 with laboratory and haematological parameters.

Subject Group	% HbF	Platelet count ($10^9/l$)	WBC count ($10^9/l$)	RBC count ($10^{12}/l$)	Reticulocytes (%)	Haematocrit	Hb	LDH (u/l)
SCA $n = 57$	r^s 0.153 ($n = 46$) P 0.309	-0.036 0.790	0.210 0.117	0.096 0.480	0.134 0.321	0.017 0.9026	-0.0003 0.998	0.145 ($n = 55$) 0.290
SCAHC $n = 46$	r^s -0.236 ($n = 40$) P 0.143	0.161 0.284	0.377 <u>0.01</u>	0.014 0.927	0.245 0.102	0.012 0.935	0.015 0.920	0.354 ($n = 42$) <u>0.022</u>
SCA and SCAHC $n = 103$	r^s -0.102 ($n = 86$) P 0.350	0.062 0.534	0.284 <u>0.004</u>	0.061 0.540	0.170 0.0861	-0.018 0.858	-0.035 0.727	0.260 ($n = 97$) <u>0.01</u>
HbSC $n = 22$	r^s 0.111 ($n = 20$) P 0.064	0.591 <u>0.004</u>	0.210 0.349	0.047 0.840	-0.342 0.119	0.003 0.990	0.018 0.936	N/D

Levels of TNFSF14 in the plasma of steady-state sickle cell anaemia (SCA), SCA patients on HC therapy (20–30 mg/kg/d; SCAHC) and haemoglobin SC individuals (HbSC) were determined by ELISA and correlated with available laboratory and haematological data. HbF, fetal haemoglobin; WBC, white blood cell; RBC, red blood cell; LDH, serum lactate dehydrogenase. N/D, not determined. Correlations were calculated using Spearman's test and significant correlations ($P < 0.05$) are underlined.

Table III. Correlation of plasma TNFSF14 with plasma cytokine and adhesion molecule levels.

Subject group	sCD40LG		IL8		sICAM1		sVCAM1	
	Mean $\pm$ SEM (pg/ml)	Correlation with pTNFSF14	Mean $\pm$ SEM (pg/ml)	Correlation with pTNFSF14	Mean $\pm$ SEM (ng/ml)	Correlation with pTNFSF14	Mean $\pm$ SEM (ng/ml)	Correlation with pTNFSF14
CON	279.8 $\pm$ 55.5 <i>n</i> = 40	r^2 = 0.214 P > 0.05	4.08 $\pm$ 0.22 <i>n</i> = 12	r^2 = -0.500 P = 0.267	175.5 $\pm$ 9.3 <i>n</i> = 20	r^2 = 0.280 P > 0.05	655 $\pm$ 50.2 <i>n</i> = 10	r^2 = 0.241 P > 0.05
SCA	984.2 $\pm$ 133.7 <i>n</i> = 57 ***	r^2 = 0.629 P < 0.0001	12.39 $\pm$ 3.33 <i>n</i> = 15 ***	r^2 = 0.611 P = 0.02	215.7 $\pm$ 20.7 <i>n</i> = 31	r^2 = 0.377 P = 0.04	1420 $\pm$ 156 <i>n</i> = 18 ***	r^2 = 0.042 P > 0.05
SCAHC	1240.0 $\pm$ 199.6 <i>n</i> = 43 ***	r^2 = 0.601 P < 0.0001	8.52 $\pm$ 0.80 <i>n</i> = 15 ***	r^2 = 0.682 P = 0.005	221.0 $\pm$ 15.7 <i>n</i> = 23	r^2 = 0.049 P > 0.05	1257 $\pm$ 134 <i>n</i> = 12 ***	r^2 = 0.126 P > 0.05
SCA/SCAHC	1094.0 $\pm$ 114.9 <i>n</i> = 100 ***	r^2 = 0.588 P < 0.0001	10.46 $\pm$ 1.72 <i>n</i> = 30 ***	r^2 = 0.575 P = 0.0009	217.6 $\pm$ 13.4 <i>n</i> = 54*	r^2 = 0.243 P = 0.08	1355 $\pm$ 107 <i>n</i> = 30 ***	r^2 = 0.066 P > 0.05
HbSC	364.4 $\pm$ 90.2 <i>n</i> = 22	r^2 = 0.425 P < 0.048	N/D	P = 0.0009	N/D	N/D	N/D	N/D

Levels of TNFSF14 in the plasma of healthy control individuals (CON), steady-state sickle cell anaemia (SCA), SCA patients on HC therapy (20–30 mg/kg/d; SCAHC) and haemoglobin SC individuals (HbSC) were determined by ELISA and correlated with plasma levels of sCD40LG, IL8, sICAM1 and sVCAM1. Correlations were calculated using Spearman's test and significant correlations (P < 0.05) are underlined.

* P < 0.05.

*** P < 0.001 compared to healthy-control population.

SCA platelets are an important source of TNFSF14

Washed platelets from healthy control and SCA individuals were stimulated (20 μ mol/l ADP or 10 μ g/ml human collagen type I), or not, and their release of TNFSF14 into the supernatant over a 90-min period was determined by ELISA. Significant concentrations of TNFSF14 were detected in the supernatant of platelets from both control and SCA individuals, indicating that platelets are an important source of this cytokine in the circulation (Fig 3A). Release of TNFSF14 from SCA platelets was significantly augmented by incubation with collagen, but not ADP (Fig 3A), indicating that collagen stimulation may be a modulator of TNFSF14 release from platelets in SCA. Importantly, TNFSF14 levels in the plasma were found to correlate significantly with the platelet P-selectin expression in SCA (r = 0.547, P = 0.003, n = 28), emphasizing a possible role for platelet activation in TNFSF14 production in SCA.

SCA platelets release TNFSF14 in association with sCD40LG release

The release of sCD40LG from washed platelets of SCA individuals was also determined in the presence or absence of a collagen stimulus (10 μ g/ml human collagen type). Interestingly, basal and collagen-stimulated TNFSF14 release correlated tightly with CD40LG release from SCA platelets (Fig 3B, C respectively).

SCA platelets demonstrate altered TNFSF14 receptor expression

Flow cytometry was used to determine the expressions of the TNFSF14 receptors, TNFRSF14 and LTBR on the surface of non-stimulated platelets from CON, SCA and SCAHC individuals (Fig 4A, B). TNFRSF14 expression was increased on SCA platelets, but not on SCAHC platelets; in contrast, LTBR expression was higher (but not significantly) on SCAHC platelets than on SCA platelets. No significant correlations were found between the expressions of these receptors or with markers of platelet activation in any of these groups (data not shown).

Levels of the soluble TNFSF14 receptor, TNFRSF6B, are augmented in the plasma of SCA patients on HC therapy (SCAHC)

Levels of soluble TNFRSF6B were measured by ELISA in the plasma of healthy control individuals, SCA patients not on HC and SCAHC patients (Fig 4D). Levels were found to be augmented, but not significantly so, in SCA patients and significantly increased in SCAHC patients, compared to levels in control individual plasma. Plasma TNFRSF6B levels correlated positively (but not significantly) with plasma TNFSF14 in SCA (r^2 = 0.241,

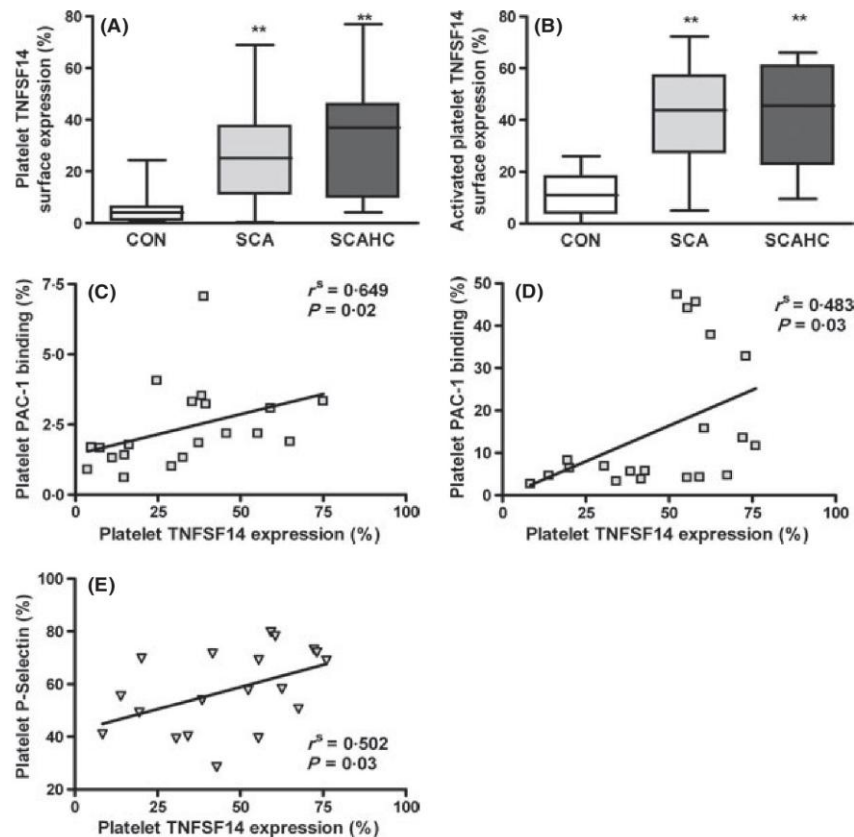


Fig 2. Surface expression of TNFSF14 on non-stimulated (A) and ADP-activated (B) platelets of healthy control individuals (CON), SCA and SCA patients on hydroxycarbamide (20–30 mg/kg/d; SCAHC). Unwashed platelets in platelet-rich plasma were stimulated, or not, with 20 $\mu\text{mol/l}$ ADP (30 min, room temperature) and TNFSF14 expression determined by flow cytometry. Correlation of non-stimulated (C) and ADP-stimulated (D) surface TNFSF14 expression on platelets from SCA individuals with PAC-1 antibody binding. (E) Correlation of ADP-stimulated surface TNFSF14 expression on platelets from SCA individuals alone with P-selectin expression. Data demonstrate the percentage of platelets expressing TNFSF14, P-selectin or binding PAC-1 antibody ($n = 15, 20$ and 14 for CON, SCA and SCAHC respectively). ** $P < 0.01$ compared to CON.

$P > 0.05$, $n = 16$) and SCAHC individuals ($r^2 = 0.218$, $P > 0.05$, $n = 14$).

High levels of plasma TNFSF14 are associated with elevated TRV and increased lactate hydrogenase in sickle cell anaemia

To investigate whether TNFSF14 may be a causative factor or a marker of clinical complications in SCD, we stratified patients into those with high plasma TNFSF14 and those with low-to-moderate plasma TNFSF14. High plasma TNFSF14 was defined as a TNFSF14 concentration above a calculated cut-off value of 30.0 pg/ml (the 75% percentile value for TNFSF14 concentrations in the entire SCA popu-

lation studied). Clinical data were collected for patients from the University of Campinas cohort (both SCA and SCAHC; $n = 47$) and the presence or absence of clinical manifestations in the two patient populations (low-to-moderate or high TNFSF14) were compared using Fisher's exact test. No associations of stroke, osteonecrosis, leg ulcer, priapism or acute chest syndrome were observed ($P > 0.05$) with high levels of TNFSF14 (see Table IV). In contrast, a significant association of high plasma TNFSF14 was found with elevated TRV (≥ 2.5 m/s) ($P < 0.001$) (see Table IV). Median (interquartile range) plasma TNFSF14 concentrations were 21.0 (8.5–229.7; $n = 34$) pg/ml and 41.8 (33.7–143.5; $n = 7$) pg/ml ($P = 0.025$, Mann–Whitney test) for SCA/SCAHC patients with a TRV of

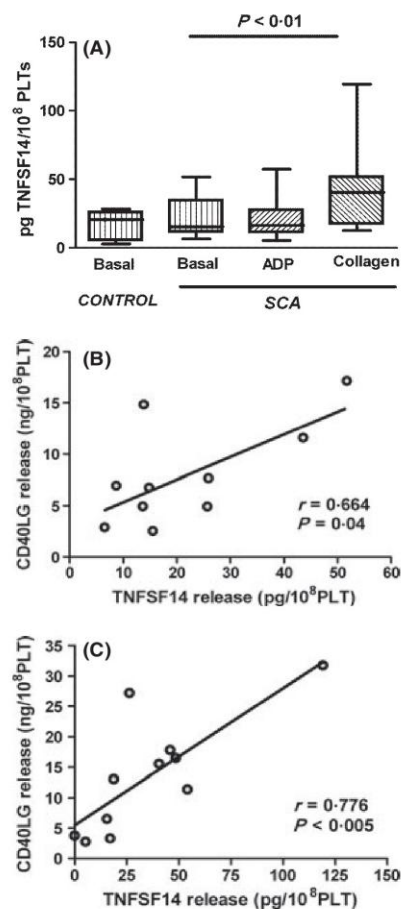


Fig 3. (A) Production and secretion of TNFSF14 from washed Control and SCA individual platelets. Correlation of TNFSF14 release with CD40LG release from SCA platelets, under non-stimulated basal (B) conditions and following stimulation with collagen (C). Washed platelets in Kreb's solution (2×10^8 platelets (PLT)/ml) were incubated in the absence or presence of ADP (20 μ mol/l) or collagen (10 μ g/ml) at 37°C for 90 min and TNFSF14 and CD40LG determined in the supernatant by ELISA.

<2.5 m/s and those with an elevated TRV (≥ 2.5 m/s) respectively. Interestingly, plasma TNFSF14 levels also significantly correlated with serum lactate dehydrogenase (LDH) levels (Table II) for SCAHC patients and the total SCA patient group (SCA + SCAHC).

Discussion

The pro-inflammatory, pro-thrombotic and atherogenic protein, TNFSF14, was found to be significantly elevated in the plasma of SCA patients. A significant elevation in the circulating concentration of TNFSF14 was found in both SCA

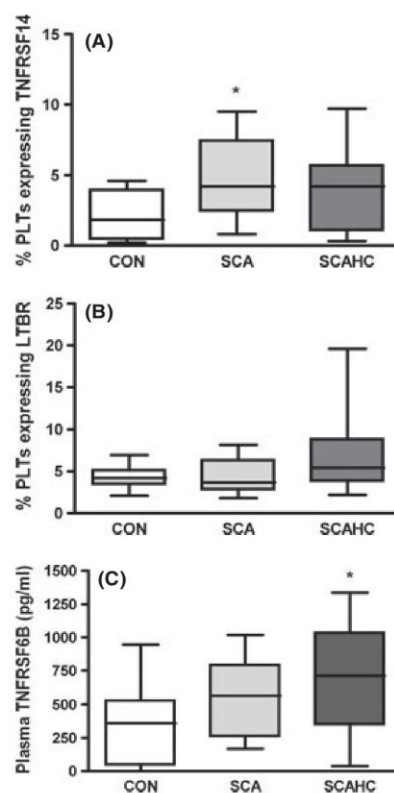


Fig 4. Expressions of the TNFSF14 receptors, TNFRSF14 (A) and LTBR (B) on the surface of non-stimulated platelets (PLTs) from healthy control individuals (CON; $n = 11$), SCA ($n = 9$) and SCA patients on hydroxycarbamide (20–30 mg/kg/d; SCAHC, $n = 14$). Receptor expression was determined by flow cytometry on unwashed platelets. Data represent the percentage of platelets expressing receptors. (C) Plasma levels of TNFRSF6B were determined in CON ($n = 17$), SCA ($n = 17$) and SCAHC ($n = 17$) individuals by ELISA. * $P < 0.05$ compared to CON.

patients not on HC therapy and in those on HC therapy. The presence of pro-inflammatory proteins in the circulation of SCD individuals plays a very important role in the activation of both the endothelium and leucocytes, inducing the adhesion of white cells to the blood vessel wall; a step that, in animal models, has been shown to initiate secondary red cell adhesion and vaso-occlusive mechanisms (Turhan *et al*, 2002). Given that the TNFSF14 protein has been shown to have an extremely potent activating effect on endothelial cells (Celik *et al*, 2007), data indicate that elevated levels of TNFSF14 could play a role in the vascular inflammation that is now known to be associated with SCD pathophysiology.

The finding that HbSC patients demonstrate intermediate levels of plasma TNFSF14 is of interest, because these patients, while presenting red cell dehydration and conse-

Table IV. Clinical complications in SCA patients with low-to-moderate plasma TNFSF14 (<30.0 pg/ml) and high plasma TNFSF14 (>30.0 mg/ml).

Clinical complication	Low-to-moderate pTNFSF14 <i>n</i> = 30	High pTNFSF14 <i>n</i> = 17	<i>P</i> -value (Fisher's Exact)
Stroke	10.0%	5.8%	<i>P</i> = 1.000
Osteonecrosis	10.0%	23.5%	<i>P</i> = 0.235
Leg ulcer	10.0%	17.6%	<i>P</i> = 0.653
Priapism	30.0% (<i>n</i> = 10)	0.0% (<i>n</i> = 7)	<i>P</i> = 0.228
Acute chest syndrome	20.0%	11.8%	<i>P</i> = 0.692
TRV $\geq$ 2.5 m/s	3.8% (<i>n</i> = 26)	40.0% (<i>n</i> = 15)	<i>P</i> = 0.006

TRV, tricuspid regurgitant velocity.

Definitions for the diagnosis of clinical complications are defined in the Patients and Methods section. The number of patients (*n*) depicted in brackets, for some parameters, indicates the total number of patients with data available for this parameter.

quent HbS polymerization, generally have lower platelet and leucocyte counts, and lower levels of intravascular haemolysis and vaso-occlusive episodes (Nagel *et al*, 2003). Data indicate that HbSC patients may present a more limited vascular inflammation, and the finding that TNFSF14 levels are lower than those observed in SCA is in keeping with the different pathophysiology of this disease.

Activated endothelium expresses high levels of adhesion molecules, such as ICAM1 and VCAM1, and produces high concentrations of cytokines and chemokines, including IL8 (Galley & Webster, 2004). Plasma TNFSF14 levels correlated with IL8, and to some extent sICAM1, in SCA, indicating that TNFSF14 may participate in, or reflect, endothelial activation. The very significant correlations of circulating TNFSF14 and platelet release of TNFSF14 with CD40LG indicate that the production of these two proteins may be tightly coupled. TNFSF14 protein production and release occurs following the activation of the cells that produce this cytokine. To date, reports indicate that TNFSF14 can be synthesized by platelets, as well as by T cells, monocytes and granulocytes (Granger & Rickert, 2003). TNFSF14 protein was highly expressed on the platelet surface in SCA and this expression appears to be associated with platelet activation (as demonstrated by the correlation of platelet surface TNFSF14 with PAC-1 antibody binding and P-selectin expression). Platelet surface expression of TNFSF14 was further augmented following the stimulation of platelets and, as membrane-bound TNFSF14 can mediate the adhesion of platelets to the endothelium (Celik *et al*, 2007), this may be one of the mechanisms by which platelets localize on the vessel wall in SCA with subsequent release of inflammatory mediators. The release of significant levels of TNFSF14 from SCA platelets, both under basal conditions and when stimu-

lated with collagen, indicates that platelets may be a very important source of TNFSF14 in SCA. Moreover, the finding that high TNFSF14 levels in plasma were associated with increased platelet activation (as shown by platelet P-selectin expression), rather than platelet counts, further supports the role for platelets in TNFSF14 production in SCA.

Interestingly, SCAHC patients also presented significantly elevated circulating TNFSF14 levels and platelet TNFSF14 expression, even though HC therapy reduced other inflammatory parameters, including IL8, in the same patients. Data may suggest that the activation of cells that produce TNFSF14 protein, including platelets, may not be sufficiently decreased during HC therapy to decrease TNFSF14 production. As such, it may be important to identify therapies for use in association with HC to efficiently reduce vascular inflammation. The expression of the TNFSF14 receptor, TNFRSF14, on platelets was increased in SCA, but not in SCAHC patients. In contrast, LTBR expression was slightly increased on the surface of platelets of SCAHC patients. To our knowledge, the expressions of TNFRSF14 and LTBR have not been reported previously on platelets; as such, the effect of ligand binding to these receptors, and therefore on platelet function, is not known; however both receptors are known to promote and modulate immune and inflammatory processes in other cell types, such as T-cells, macrophages and endothelial cells (Ware, 2009; Xu *et al*, 2011). The TNFRSF6B protein is a soluble receptor that is capable of attenuating the effects of TNFSF14 as well as two other TNFSF members, Fas Ligand and TNF-like molecule 1A, and has been found to be upregulated in inflammatory diseases, indicating potential as a promising therapeutic agent for inflammatory conditions (Lin & Hsieh, 2011). Interestingly, while TNFRSF6B concentrations were relatively increased in the plasma of SCA individuals, levels were more significantly augmented in SCAHC patients, indicating that one of the benefits of HC therapy in SCA could include the upregulation of the TNFRSF6B immunomodulator to neutralize the effects of TNFSF cytokines, such as TNFSF14.

A sub-population of SCA patients presented extremely high levels of TNFSF14, reaching concentrations, in some patients, of approximately 20-fold the healthy control concentration. We investigated whether any clinical complications were more commonly encountered in patients with the high plasma TNFSF14 concentrations (>75 percentile concentration). Interestingly a significant association between high TNFSF14 and elevated TRV ($\geq$ 2.5 m/s) was found in SCA patients. Pulmonary hypertension (PHT) is a recognized complication of SCD and is associated with an increased risk for mortality (Castro & Gladwin, 2005). Although right heart catheterization is required for the direct measurement of pulmonary artery pressure and vascular resistance and, therefore for the diagnosis of PHT, a TRV of $\geq$ 2.5 m/s (as measured by Doppler echocardiography) is considered to be indicative of PHT and a TRV of >2.8 m/s is reported to be highly indicative of manifest PHT (Hassell, 2011). Importantly,

while we considered a TRV of >2.5 m/s to be elevated for this study, all of the SCA/SCAHC patients with TRV >2.8 m/s also demonstrated high plasma TNFSF14 (>30 pg/ml) ($P < 0.01$ association of high TNFSF14 with TRV >2.8 m/s; $n = 5/41$). Additionally, we also found a significant correlation of plasma TNFSF14 with serum LDH in SCA. As LDH has been reported as a biomarker for haemolysis-related PHT in SCD (Kato *et al*, 2006), taken together, these data indicate that high TNFSF14 concentrations may be associated with clinical indications of PHT. However, as these data are derived from a patient cohort of limited size, further investigations with a larger patient population are required for confirmation of this interesting finding; nevertheless, this observation lends further support to the hypothesis that elevated levels of TNFSF14 may play a role in the complicated pathophysiology of SCD, with clinical consequences.

In conclusion, the potent pro-inflammatory and atherogenic protein, TNFSF14, was significantly elevated in the plasma of the majority of SCA patients studied, in association with other markers of inflammation and endothelial activation. Platelets appear to contribute to the production of TNFSF14 in SCA, as a function of platelet activation, and also express receptors for TNFSF14 on their surface. Our data emphasize the role that platelets and their activation may play in the vascular inflammation that triggers vaso-occlusive mechanisms. Future investigations will determine the extent of the contribution of TNFSF14 to endothelial activation and inflammation in SCA, as well as its clinical

complications, and whether this protein holds promise as a potential therapeutic target for the disease.

Acknowledgements

This study was funded by FAPESP and CNPq, Brazil. The Haematology and Haemotherapy Centre, UNICAMP, forms part of the National Institute of Blood, Brazil (INCT de Sangue, CNPq/MCT/FAPESP).

Authorship and disclosures

VTG conceived the study, designed and performed experimental work, analysed results and wrote the manuscript; RPF and VMD contributed to the experimental work and participated in the analysis of the results; FT participated in the selection of patients, clinical follow up of patients, and the writing of the manuscript; MACB and ASA participated in the selection of and clinical follow up of patients; MRBM carried out flow cytometry; MPC participated in the selection of patients, clinical follow up of patients, and clinical data review. STOS and FFC contributed to the selection of patients, clinical follow up of patients and reviewed the manuscript; NC conceived the study, designed experiments and analysed results and wrote the manuscript. All authors have read and approved the final manuscript. The authors report no potential conflicts of interest.

References

- Anand, S., Wang, P., Yoshimura, K., Choi, I.H., Hilliard, A., Chen, Y.H., Wang, C.R., Schulick, R., Flies, A.S., Flies, D.B., Zhu, G., Xu, Y., Pardoll, D.M., Chen, L. & Tamada, K. (2006) Essential role of TNF family molecule LIGHT as a cytokine in the pathogenesis of hepatitis. *Journal of Clinical Investigation*, **116**, 1045–1051.
- Aukrust, P., Sandberg, W.J., Otterdal, K., Vinge, L. E., Gullestad, L., Yndestad, A., Halvorsen, B. & Ueland, T. (2011) Tumor necrosis factor superfamily molecules in acute coronary syndromes. *Annals of Medicine*, **43**, 90–103.
- Castro, O. & Gladwin, M.T. (2005) Pulmonary hypertension in sickle cell disease: mechanisms, diagnosis, and management. *Hematology/Oncology Clinics of North America*, **19**, 881–896.
- Celik, S., Langer, H., Stellos, K., May, A.E., Shankar, V., Kurz, K., Katus, H.A., Gawaz, M.P. & Dengler, T.J. (2007) Platelet-associated LIGHT (TNFSF14) mediates adhesion of platelets to human vascular endothelium. *Thrombosis and Haemostasis*, **98**, 798–805.
- Celik, S., Shankar, V., Richter, A., Hippe, H.J., Akhavanpoor, M., Bea, F., Erbel, C., Urban, S., Blank, N., Wambsgans, N., Katus, H.A. & Dengler, T.J. (2009) Proinflammatory and prothrombotic effects on human vascular endothelial cells of immune-cell-derived LIGHT. *European Journal of Medical Research*, **14**, 147–156.
- Chang, Y.H., Hsieh, S.L., Chao, Y., Chou, Y.C. & Lin, W.W. (2005) Proinflammatory effects of LIGHT through HVEM and LTbetaR interactions in cultured human umbilical vein endothelial cells. *Journal of Biomedical Science*, **12**, 363–375.
- Conran, N. & Costa, F.F. (2009) Hemoglobin disorders and endothelial cell interactions. *Clinical Biochemistry*, **42**, 1824–1838.
- Conran, N., Fattori, A., Saad, S.T. & Costa, F.F. (2004) Increased levels of soluble ICAM-1 in the plasma of sickle cell patients are reversed by hydroxyurea. *American Journal of Hematology*, **76**, 343–347.
- Croizat, H. (1994) Circulating cytokines in sickle cell patients during steady state. *British Journal of Haematology*, **87**, 592–597.
- Duits, A.J., Pieters, R.C., Saleh, A.W., van Rosmalen, E., Katerberg, H., Berend, K. & Rojer, R.A. (1996) Enhanced levels of soluble VCAM-1 in sickle cell patients and their specific increment during vasoocclusive crisis. *Clinical Immunology and Immunopathology*, **81**, 96–98.
- Frenette, P.S. (2004) Sickle cell vasoocclusion: heterotypic, multicellular aggregations driven by leukocyte adhesion. *Microcirculation*, **11**, 167–177.
- Galley, H.F. & Webster, N.R. (2004) Physiology of the endothelium. *British Journal of Anaesthesia*, **93**, 105–113.
- Graido-Gonzalez, E., Doherty, J.C., Bergreen, E.W., Organ, G., Telfer, M. & McMillen, M.A. (1998) Plasma endothelin-1, cytokine, and prostaglandin E2 levels in sickle cell disease and acute vaso-occlusive sickle crisis. *Blood*, **92**, 2551–2555.
- Granger, S.W. & Rickert, S. (2003) LIGHT-HVEM signaling and the regulation of T cell-mediated immunity. *Cytokine and Growth Factor Reviews*, **14**, 289–296.
- Hassell, K.L. (2011) Pulmonary hypertension, tricuspid regurgitant velocity screening, and the nitric oxide pathway. *Hematology American Society of Hematology. Education Program*, **2011**, 419–426.
- Henn, V., Slupsky, J.R., Grafe, M., Anagnostopoulos, I., Forster, R., Muller-Berghaus, G. & Kroczek, R.A. (1998) CD40 ligand on activated platelets triggers an inflammatory reaction of endothelial cells. *Nature*, **391**, 591–594.
- Hibbert, J.M., Hsu, L.L., Bhatena, S.J., Irune, I., Sarfo, B., Creary, M.S., Gee, B.E., Mohamed, A.L., Buchanan, I.D., Al-Mahmoud, A. & Stiles, J.K. (2005) Proinflammatory cytokines and the hypermetabolism of children with sickle cell disease. *Experimental Biology and Medicine*, **230**, 68–74.
- Kato, G.J., McGowan, V., Machado, R.F., Little, J. A., Taylor, J.T., Morris, C.R., Nichols, J.S., Wang, X., Poljakovic, M., Morris, Jr, S.M. & Gladwin, M.T. (2006) Lactate dehydrogenase as a biomarker of hemolysis-associated nitric oxide resis-

- tance, priapism, leg ulceration, pulmonary hypertension, and death in patients with sickle cell disease. *Blood*, **107**, 2279–2285.
- Kim, W.J., Kang, Y.J., Koh, E.M., Ahn, K.S., Cha, H.S. & Lee, W.H. (2005) LIGHT is involved in the pathogenesis of rheumatoid arthritis by inducing the expression of pro-inflammatory cytokines and MMP-9 in macrophages. *Immunology*, **114**, 272–279.
- Klinger, M.H. & Jelkmann, W. (2002) Role of blood platelets in infection and inflammation. *Journal of Interferon and Cytokine Research*, **22**, 913–922.
- Lanaro, C., Franco-Penteado, C.F., Albuquerque, D.M., Saad, S.T., Conran, N. & Costa, F.F. (2009) Altered levels of cytokines and inflammatory mediators in plasma and leukocytes of sickle cell anemia patients and effects of hydroxyurea therapy. *Journal of Leukocyte Biology*, **85**, 235–242.
- Lee, W.H., Kim, S.H., Lee, Y., Lee, B.B., Kwon, B., Song, H., Kwon, B.S. & Park, J.E. (2001) Tumor necrosis factor receptor superfamily 14 is involved in atherogenesis by inducing proinflammatory cytokines and matrix metalloproteinases. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, **21**, 2004–2010.
- Lee, S.P., Ataga, K.I., Orringer, E.P., Phillips, D.R. & Parise, L.V. (2006) Biologically active CD40 ligand is elevated in sickle cell anemia: potential role for platelet-mediated inflammation. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, **26**, 1626–1631.
- Lin, W.W. & Hsieh, S.L. (2011) Decoy receptor 3: a pleiotropic immunomodulator and biomarker for inflammatory diseases, autoimmune diseases and cancer. *Biochemical Pharmacology*, **81**, 838–847.
- Mauri, D.N., Ebner, R., Montgomery, R.L., Kochel, K.D., Cheung, T.C., Yu, G.L., Ruben, S., Murphy, M., Eisenberg, R.J., Cohen, G.H., Spear, P. G. & Ware, C.F. (1998) LIGHT, a new member of the TNF superfamily, and lymphotoxin alpha are ligands for herpesvirus entry mediator. *Immunity*, **8**, 21–30.
- Nagel, R.L., Fabry, M.E. & Steinberg, M.H. (2003) The paradox of hemoglobin SC disease. *Blood Reviews*, **17**, 167–178.
- Otterdal, K., Smith, C., Oie, E., Pedersen, T.M., Yndestad, A., Stang, E., Endresen, K., Solum, N.O., Aukrust, P. & Damas, J.K. (2006) Platelet-derived LIGHT induces inflammatory responses in endothelial cells and monocytes. *Blood*, **108**, 928–935.
- Polanowska-Grabowska, R., Wallace, K., Field, J.J., Chen, L., Marshall, M.A., Figler, R., Gear, A.R. & Linden, J. (2010) P-selectin-mediated platelet-neutrophil aggregate formation activates neutrophils in mouse and human sickle cell disease. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, **30**, 2392–2399.
- Sandberg, W.J., Halvorsen, B., Yndestad, A., Smith, C., Otterdal, K., Brosstad, F.R., Froland, S.S., Olofsson, P.S., Damas, J.K., Gullestad, L., Hansson, G.K., Oie, E. & Aukrust, P. (2009) Inflammatory interaction between LIGHT and proteinase-activated receptor-2 in endothelial cells: potential role in atherogenesis. *Circulation Research*, **104**, 60–68.
- Stuart, M.J. & Nagel, R.L. (2004) Sickle-cell disease. *Lancet*, **364**, 1343–1360.
- Turhan, A., Weiss, L.A., Mohandas, N., Collier, B. S. & Frenette, P.S. (2002) Primary role for adherent leukocytes in sickle cell vascular occlusion: a new paradigm. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **99**, 3047–3051.
- Ware, C.F. (2009) Targeting the LIGHT-HVEM pathway. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, **647**, 146–155.
- Wun, T., Cordoba, M., Rangaswami, A., Cheung, A.W. & Paglieroni, T. (2002) Activated monocytes and platelet-monocyte aggregates in patients with sickle cell disease. *Clinical and Laboratory Haematology*, **24**, 81–88.
- Xu, Y., Zhang, C., Wang, N., Ling, F., Li, P., Gao, Y. & Hua, W. (2011) Adiponectin inhibits lymphotoxin-beta receptor-mediated NF-kappaB signaling in human umbilical vein endothelial cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **404**, 1060–1064.

JOHN WILEY AND SONS LICENSE TERMS AND CONDITIONS

Apr 07, 2014

This is a License Agreement between Vanessa T Garrido ("You") and John Wiley and Sons ("John Wiley and Sons") provided by Copyright Clearance Center ("CCC"). The license consists of your order details, the terms and conditions provided by John Wiley and Sons, and the payment terms and conditions.

All payments must be made in full to CCC. For payment instructions, please see information listed at the bottom of this form.

License Number	3363641470943
License date	Apr 07, 2014
Licensed content publisher	John Wiley and Sons
Licensed content publication	British Journal of Haematology
Licensed content title	Elevated plasma levels and platelet-associated expression of the pro-thrombotic and pro-inflammatory protein, TNFSF14 (LIGHT), in sickle cell disease
Licensed copyright line	© 2012 Blackwell Publishing Ltd
Licensed content author	Vanessa T. Garrido, Renata Proença-Ferreira, Venina M. Dominical, Fabiola Traina, Marcos A. C. Bezerra, Mariana R. B. Mello, Marina P. Colella, Aderson S. Araújo, Sara T. O. Saad, Fernando F. Costa, Nicola Conran
Licensed content date	Jul 6, 2012
Start page	788
End page	797
Type of use	Dissertation/Thesis
Requestor type	Author of this Wiley article
Format	Print and electronic
Portion	Full article
Will you be translating?	No
Title of your thesis / dissertation	Role of the pro-inflammatory cytokines, LIGHT and CD40L, in platelet-mediated inflammation in sickle cell anemia
Expected completion date	Apr 2014
Expected size (number of pages)	177
Total	0.00 USD

Terms and Conditions

Terms and Conditions are not available at this time.

If you would like to pay for this license now, please remit this license along with your

payment made payable to "COPYRIGHT CLEARANCE CENTER" otherwise you will be invoiced within 48 hours of the license date. Payment should be in the form of a check or money order referencing your account number and this invoice number RLNK501271391. Once you receive your invoice for this order, you may pay your invoice by credit card. Please follow instructions provided at that time.

Make Payment To:
Copyright Clearance Center
Dept 001
P.O. Box 843006
Boston, MA 02284-3006

For suggestions or comments regarding this order, contact RightsLink Customer Support: customercare@copyright.com or +1-877-622-5543 (toll free in the US) or +1-978-646-2777.

Gratis licenses (referencing \$0 in the Total field) are free. Please retain this printable license for your reference. No payment is required.
