



PEDRO PAULO DIAS JUNIOR

**“AVALIAÇÃO DAS PROTEÍNAS
INFLAMATÓRIAS CD40L E LIGHT NAS
PROPRIEDADES ADESIVAS DOS
NEUTRÓFILOS E OUTROS TIPOS
CELULARES”**

CAMPINAS

2012



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS**

PEDRO PAULO DIAS JUNIOR

**“AVALIAÇÃO DAS PROTEÍNAS
INFLAMATÓRIAS CD40L E LIGHT NAS
PROPRIEDADES ADESIVAS DOS NEUTRÓFILOS
E OUTROS TIPOS CELULARES”**

ORIENTADORA: Profa. Dra. Nicola Amanda Conran Zorzetto

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas para a Obtenção do Título de Mestre em Ciências Médicas, área de concentração em Ciências Biomédicas.

**ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA
DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PELO ALUNO PEDRO PAULO
DIAS JUNIOR E ORIENTADO PELA PROF. DRA. NICOLA
AMANDA CONRAN ZORZETTO.**

Assinatura do Orientador

CAMPINAS

2012

Unidade BECL
T/UNICAMP D543a
Cutter _____
V. _____ Ed. _____
Tombo BC 98170
Proc. 16-94-13
C _____ D X
Preço R\$ 11,90
Data 07/02/13
Cód. tit. 881772

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
MARISTELLA SOARES DOS SANTOS – CRB8/8402
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
UNICAMP

D543a Dias Junior, Pedro Paulo, 1986-
Avaliação das proteínas inflamatórias CD40L e
LIGHT nas propriedades adesivas dos neutrófilos e
outros tipos celulares / Pedro Paulo Dias Junior. --
Campinas, SP : [s.n.], 2012.

Orientador : Nicola Amanda Conran Zorzetto.
Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de
Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Inflamação. 2. Neutrófilos. 3. Adesão celular. I.
Zorzetto, Nicola Amanda Conran. II. Universidade
Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.
III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em inglês: Evaluation of inflammatory proteins CD40L and LIGHT in adhesive properties of neutrophils and other cell types.

Palavras-chave em inglês:

Inflammation

Neutrophils

Cell adhesion

Área de concentração: Ciências Biomédicas

Titulação: Mestre em Ciências Médicas

Banca examinadora:

Nicola Amanda Conran Zorzetto [Orientador]

Alessandra Gambero

Camila Bononi de Almeida

Data da defesa: 31-10-2012

Programa de Pós-Graduação: Ciências Médicas

Banca examinadora de Dissertação de Mestrado

Pedro Paulo Dias Junior

Orientador(a): Prof(a). Dr(a). Nicola Amanda Conran Zorzetto

Membros:	
Professor (a) Doutor (a) Alessandra Gambero -	
Professor (a) Doutor (a) Camila Bononi de Almeida -	
Professor (a) Doutor (a) Nicola Amanda Conran Zorzetto -	

Curso de pós-graduação em Ciências Médicas da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 31/10/2012

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus pela oportunidade de crescimento pessoal e profissional.

À Dra. Nicola Conran, pela orientação, amizade, paciência e compreensão. Nos momentos mais difíceis, seus conselhos e decisões foram fundamentais para o desenvolvimento desse trabalho.

Ao Dr. Fernando Ferreira Costa, obrigado pela oportunidade em fazer parte desse grupo de pesquisa.

Aos meus pais (Pedro Paulo Dias e Cleomara da Silva) e minha irmã (Leticia da Silva), obrigado pelo apoio incondicional e por ser a minha família.

Agradeço aos meus amigos - Ricardo Monteiro de Barros, Bruno César Gomes, Gustavo Ribeiro de Souza Pinto, Enrique Rodriguez, Thiago Baston, Aurélio Theodoro de Souza e Jorge Rezeck pelos anos de convivência, companheirismo e que em todos os momentos estiveram ao meu lado. Muito obrigado à todos vocês!

Agradeço à todos do Laboratório de Biologia Molecular do Hemocentro da Unicamp, pela amizade e apoio no desenvolvimento deste trabalho!

Agradeço à todos que participaram direta ou indiretamente no desenvolvimento deste trabalho! Vocês foram muito importantes para a realização desse sonho. Obrigado!

Resumo

A resposta vascular inflamatória envolve a interação complexa entre células. A adesão dos neutrófilos aos sítios inflamatórios é constituído de várias etapas que envolvem a interação das moléculas de adesão com os neutrófilos, intermediado pela L-selectina (CD62L) e pelas integrinas β_2 , LFA-1 e Mac-1 (CD11a/CD18 e CD11b/CD18) com ligantes sobre o endotélio. Os eritrócitos podem aderir ao endotélio vascular usando as moléculas de adesão CD 36 e integrina VLA-4 entre outras moléculas de adesão. O mecanismo de adesão das plaquetas envolve o sequestro celular no local da lesão tecidual através da interação de quatro receptores sinérgicos: a glicoproteína GPIb/IX (CD42b/CD42a), a integrina $\alpha_2\beta_1$ (GPIa/IIa; CD49b/CD41a), a integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$ (GPIIb/IIIa; CD41a/CD61), e a integrina $\alpha_5\beta_1$ (GPIc/IIIa; CD51/CD61). Em doenças associadas com a inflamação vascular, tais como a doença falciforme e aterosclerose, alterações na adesão de leucócitos à parede vascular desempenham um papel central na fisiopatologia da doença. O CD40L e o LIGHT são proteínas citocinas pertencente ao fator de necrose tumoral (TNF), tendo como receptores o CD40L, LTBR e o HVEM, respectivamente. Diante disso, este estudo objetivou avaliar os efeitos das proteínas inflamatórias CD40L e LIGHT nas propriedades adesivas dos neutrófilos, hemácias e plaquetas. Os neutrófilos, hemácias e plaquetas foram separados do sangue periférico e foram realizados ensaios de adesão estática e citometria de fluxo após estímulo destas células com as proteínas recombinantes, CD40L e LIGHT. Após incubação com CD40L ou LIGHT, os neutrófilos e hemácias da circulação periférica apresentaram alterações quanto às propriedades adesivas em relação aos neutrófilos e hemácias não estimulados. As plaquetas estimuladas com as citocinas não demonstraram alteração nas propriedades adesivas. Neutrófilos incubados com anticorpos bloqueadores das integrinas Mac-1 e LFA-1 apresentaram uma reversão no aumento das propriedades adesivas após estímulo com CD40L ou LIGHT. Os neutrófilos estimulados com as citocinas apresentaram uma diminuição na expressão proteica de CD62L, característica de ativação celular. Não foi observado nenhuma diferença quanto a expressão das integrinas Mac-1 e LFA-1 nos neutrófilos após estímulo com as citocinas. Esses resultados sugerem que essas proteínas inflamatórias podem aumentar as propriedades adesivas de neutrófilos (intermediado por um aumento na afinidade das integrinas) e hemácias. A presença de altas concentrações destas

citocinas na circulação, como encontrados em algumas patologias caracterizadas por inflamação vascular, pode resultar em consequências importantes, como a indução da adesão dos leucócitos e hemácias à parede vascular.

Abstract

The vascular inflammatory response involves a complex interaction between cells. The adhesion of neutrophils to inflammatory sites is composed of several stages involving the interaction of adhesion molecules on neutrophils and on the endothelium. These interactions are mediated by L-selectin (CD62L) and the $\beta 2$ integrins, LFA-1 and Mac-1 (CD11a/CD18 and CD11b / CD18, respectively) with ligands on the endothelium. The red cells may adhere to vascular endothelial adhesion molecules using CD 36 and the VLA-4 integrin and other adhesion molecules. The mechanism of adhesion of platelets involves the adhesion of these cells at the site of tissue injury through the interaction of four synergistic receptors: glycoprotein GPIb/IX (CD42b/CD42a), integrin $\alpha 2\beta 1$ (GPIa/IIa; CD49b/CD41a), integrin $\alpha IIb\beta 3$ (GPIIb / IIIa, CD41a/CD61), and integrin $\alpha 5\beta 1$ (GPIC/ IIIa; CD51/CD61). In diseases associated with vascular inflammation, such as sickle cell disease and atherosclerosis, changes in leukocyte adhesion to the vascular wall plays a central role in the pathophysiology of the disease. The CD40L and LIGHT cytokines are proteins belonging to the tumor necrosis factor (TNF) family, and interact with the receptors, CD40L, LTBR and HVEM, respectively. Thus, this study aimed to evaluate the effects of the inflammatory proteins, CD40L and LIGHT, on the adhesive properties of neutrophils, erythrocytes and platelets. Neutrophils, erythrocytes and platelets were separated from peripheral blood and static adhesion assays and flow cytometry were performed after stimulation of these cells with the recombinant proteins, CD40L and LIGHT. After incubation with CD40L or LIGHT, neutrophils and red blood cells from the peripheral circulation showed alterations in adhesive properties compared to unstimulated neutrophils and erythrocytes. Platelets stimulated with cytokines showed no changes in adhesive properties. Neutrophils incubated with antibodies that block the functions of integrins Mac-1 and LFA-1 reversed the increase in adhesive properties after stimulation with CD40L or LIGHT. Neutrophils stimulated with cytokines showed a decrease in the protein expression of CD62L, a characteristic of cellular activation. No difference was observed in the expression of the integrins Mac-1 and LFA-1 on neutrophils after stimulation with cytokines.

These results suggest that these inflammatory proteins can increase the adhesive properties of neutrophils (mediated by an increase in the affinity of the integrin) and erythrocytes. The presence of high concentrations of these cytokines in the circulation, as found in certain vascular diseases characterized by inflammation, can result in important consequences, such as the induction of the adhesion of leukocytes and red blood cells to the vascular wall.

LISTA DE ABREVIATURAS

AA – neutrófilos de indivíduos controles

ADP – adenosina difosfato

AVC - acidente vascular cerebral

BSA - soro albumina bovina

CEP – comitê de ética e pesquisa

CV - células vermelhas

DPOC - doença pulmonar obstrutiva crônica

EDTA – ácido etilenodiaminotetracético

EPM – erro padrão médio

FB - fibrinogênio

FN – fibronectina

GM-CSF - fator estimulante de crescimento de colônias de macrófago-granulócitos

Hb - hemoglobina

HTAB – Hexadeciltrimetil amônio bromida

HVEM - herpes virus entry mediator

ICAM-1- molécula de adesão intercelular-1

IL- interleucina

LFA-1 – antígeno-1 de função linfocitária

μL – microlitros

mL – mililitros

Mac-1 – antígeno-1 de macrófago

Madcam – molécula de adesão às mucosas

MFI – intensidade média de fluorescência

MPO – enzima mieloperoxidase

NFκB – fator nuclear de transcrição

NO- óxido nítrico

PBS- salina tamponada fosfatada

rpm – rotações por minuto

ROS – espécies reativas de oxigênio

TCLE – termo de consentimento livre e esclarecido

TNF-α- fator de necrose tumoral α

LTBR - lymphotoxin b receptor

VCAM-1- molécula de adesão vascular

VLA-4 – antígeno de ativação tardio tipo 4

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Expressão das proteínas CD40L, CD40, LIGHT, LT β R e HVEM na superfície dos neutrófilos (n=11), hemácias (n=5) e plaquetas (n=9), foi determinada por citometria de fluxo.

Tabela 2 – Efeito da proteína CD40L (10,50 e 100ng/mL) na expressão de (A) LFA-1, (B) MAC-1 e (C) L-selectina, na superfície de neutrófilos de indivíduos saudáveis.

Tabela 3 – Efeito da proteína LIGHT (10,50 e 100ng/mL) na expressão de (A) LFA-1 , (B) Mac-1 e (C) L-selectina , na superfície de neutrófilos de indivíduos saudáveis.

Tabela 4 – Efeito das citocinas TNF- α (10, 50 e 200ng/mL) e da IL-8 (10, 200 e 500ng/mL) na expressão de CD11b na superfície de neutrófilos.

Tabela 5 – Efeito das citocinas TNF- α (10, 50 e 200ng/mL) e da IL-8 (10, 200 e 500ng/mL) nas expressões de CD40, LT β R e HVEM na superfície de neutrófilos.

Tabela 6 – Efeito das proteínas CD40L (10,50 e 100ng/mL) e LIGHT (10,50 e 100ng/mL) na expressão de (A) CD40, (B) LT β R, (C) HVEM na superfície de neutrófilos de indivíduos saudáveis.

Tabela 7 - Efeito da proteína CD40L (10,50 e 100ng/mL) na expressão de CD41a (subunidade α_{IIb} da integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$), $\alpha_{IIb}\beta_3$ na sua conformação de alta afinidade, CD62P (P-selectina) e CD49b (subunidade $\alpha_2\beta_1$), na superfície plaquetas.

Tabela 8 - Efeito da proteína LIGHT (10,50 e 100ng/mL) na expressão de CD41a (subunidade α_{IIb} da integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$), $\alpha_{IIb}\beta_3$ na sua conformação de alta afinidade, CD62P (P-selectina) e CD49b (subunidade $\alpha_2\beta_1$), na superfície plaquetas.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Ativação e emigração celular do neutrófilo na inflamação (ETZIONI, 2001).

Figura 2: Efeito do CD40L e LIGHT na adesão dos neutrófilos a fibronectina (FN) (A) CD40L (10, 50 e 100ng/mL), n=10 e (B) LIGHT (10, 50 e 100ng/mL), n=11.

Figura 3: Efeito do CD40L e LIGHT na adesão dos neutrófilos para ICAM-1 recombinante (A) CD40L (10, 50 e 100ng/mL), n=6 e (B) LIGHT (10, 50 e 100ng/mL), n=8.

Figura 4: Efeito de anticorpos bloqueadores de Mac-1 e LFA-1 na adesão dos neutrófilos a FN, após estímulo com (A) CD40L (50ng/mL) e (B) LIGHT (100ng/mL). (n=5).

Figura 5: Efeito de anticorpos bloqueadores de Mac-1 e LFA-1 na adesão dos neutrófilos para ICAM-1 recombinante, após estímulo com (A) CD40L (50ng/mL), (B) LIGHT (100ng/mL), n=5.

Figura 6: Efeitos de CD40L e LIGHT nas propriedades adesivas dos hemácias de indivíduos saudáveis (A) CD40L (10, 50 e 100ng/mL), n=14 e (B) LIGHT (10, 50 e 100ng/mL), n=9.

Figura 7: Efeito das citocinas inflamatórias nas propriedades adesivas das plaquetas de indivíduos saudáveis (A) CD40L (10, 50 e 100ng/mL), n=6 e (B) LIGHT (10, 50 e 100ng/mL), n=6.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS.....	vii
RESUMO.....	ix
ABSTRACT.....	xi
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xiii
LISTA DE TABELAS.....	xv
LISTA DE FIGURAS.....	xvii
SUMÁRIO.....	ixx
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xxi
LISTA DE TABELAS.....	xxiii
LISTA DE FIGURAS.....	xxv
1. INTRODUÇÃO.....	19
1.1. Inflamação.....	20
1.2. Doenças Inflamatórias.....	20
1.3. A inflamação na aterosclerose e na anemia falciforme.....	21
1.3.1. Aterosclerose.....	21
1.3.2. Anemia Falciforme.....	21
1.4. Recrutamento de Leucócitos aos tecidos.....	22
1.5. Interações celulares e sinalização na inflamação.....	24
1.5.1. Moléculas de adesão e integrinas.....	24
1.6.0. Neutrófilos.....	24
1.6.1. Mecanismos de adesão dos leucócitos e seus papel nas doenças inflamatórias.....	27
1.6.2. Os eritrócitos.....	27
1.6.3. Mecanismos de adesão das hemácias.....	28
1.6.4. Plaquetas.....	29
1.6.5. Mecanismo de adesão das plaquetas.....	30
1.6.6. O papel do endotélio na inflamação.....	31
1.7. Moléculas Inflamatórias: Citocinas e Quimiocinas.....	31
1.7.1. Interleucina-8.....	32
1.7.2. Fator de Necrose Tumoral α	33
1.8. Mediadores Inflamatórios e seu papel na ativação celular.....	34
1.8.1. As proteínas CD40L e LIGHT.....	34

1.9. Justificativa.....	35
2. OBJETIVOS.....	36
2.1. Objetivos gerais.....	37
2.2. Objetivos específicos.....	37
3. ASPECTOS ÉTICOS.....	38
3.1 Aspectos éticos da pesquisa.....	39
4.MATERIAL E MÉTODOS.....	40
4.1.1. Material.....	4
4.2.1. Sujeitos da pesquisa.....	41
4.3.1. Separação de neutrófilos.....	41
4.4.1. Contagem dos neutrófilos no sangue periférico.....	42
4.5.1. Preparação de lâminas em citocentrífuga.....	42
4.6.1. Teste de Viabilidade Celular.....	43
4.7.1. Ensaio de adesão estática de neutrófilos <i>in vitro</i>	43
4.8.1. Separação de células vermelhas.....	44
4.9.1. Ensaio de adesão estática de células vermelhas <i>in vitro</i>	44
4.10.1. Separação de Plaquetas.....	45
4.11.1. Ensaio de Adesão estática de plaquetas <i>in vitro</i>	45
4.12. Citometria de Fluxo.....	46
4.12.1. Citometria de Fluxo – avaliação dos neutrófilos.....	46
4.12.2. Citometria de Fluxo – avaliação das hemácias.....	47
4.12.3. Citometria de Fluxo – avaliação das plaquetas.....	48
4.13. Análise Estatística.....	49
5. RESULTADOS.....	50
5.1.1 Efeitos das citocinas inflamatórias CD40L e LIGHT na adesão estática de neutrófilos, utilizando a FN como ligante.....	51
5.1.2 Efeitos das citocinas inflamatórias CD40L e LIGHT na adesão estática de neutrófilos, utilizando ICAM-1 como ligante.....	52

5.1.3 Adesão de neutrófilos a fibronectina após estímulo com as citocinas inflamatórias CD40L e LIGHT: efeito de anticorpos inibidores das integrinas LFA-1 e Mac-1.....	53.
5.1.4 Adesão de neutrófilos ao ICAM-1 após estímulo com as citocinas inflamatórias CD40L e LIGHT: efeito de anticorpos inibidores das integrinas LFA-1 e Mac-1.....	55
5.1.5 Efeitos das citocinas inflamatórias CD40L e LIGHT nas propriedades adesivas de hemácias.....	57
5.1.6 Efeitos das citocinas inflamatórias CD40L e LIGHT nas propriedades adesivas de plaquetas, utilizando FB como ligante.....	58
5.1.7 Expressão das proteínas (CD40L e LIGHT) e seus receptores (CD40) e (LT β R e HVEM) na superfície de neutrófilos, hemácias e plaquetas.....	59
5.1.8 Efeitos do CD40L e LIGHT na expressão das integrinas Mac-1 e LFA-1 e da L-selectina, na superfície de neutrófilos, determinado por citometria de fluxo.....	59
5.1.9 Efeito das citocinas inflamatórias, TNF- α e IL-8, na expressão dos receptores CD40 e LT β R/HVEM na superfície de neutrófilos, determinado por citometria de fluxo.....	60
5.1.10 Efeitos de CD40L e LIGHT na expressão dos receptores CD40, LT β R e HVEM na superfície de neutrófilos, determinado por citometria de fluxo.....	61
5.1.11 Efeitos de CD40L e LIGHT na expressão e atividade de moléculas de adesão na superfície das plaquetas.....	61

6. TABELAS.....	63
7. DISCUSSÃO.....	72
8. CONCLUSÃO.....	76
9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	78
10. ANEXOS.....	90

1. Introdução

1.1.1 Inflamação

A inflamação é um componente essencial do sistema imunológico que ocorre em resposta à patógenos e células danificadas. A resposta vascular inflamatória envolve a interação complexa entre células inflamatórias (neutrófilos, linfócitos, monócitos, macrófagos), células endoteliais, células da musculatura lisa e da matriz extracelular (SPRAGUE & KALIL, 2009). O recrutamento dos leucócitos para o sítio inflamatório através das camadas de células endoteliais da parede dos vasos sanguíneos é um passo fundamental da resposta inflamatória (TOETSCH et al., 2008). Este recrutamento envolve uma complexa interação entre as moléculas de adesão celular e células endoteliais.

1.2.0 Doenças inflamatórias

O papel da inflamação na iniciação e progressão da doença vascular é cada vez mais conhecido. Estudos epidemiológicos mostraram aumento de risco vascular em associação com aumento dos níveis basais de citocinas, como IL-6, TNF- α , e moléculas de adesão expressas nas células endoteliais como ICAM-1, P-selectina e E-selectina. Adicionalmente, aumentos persistentes de citocinas estão associados à disfunção vascular e doença vascular, como aterosclerose, aneurisma abdominal de aorta e hipertensão (RIDKER et al., 2000). A inflamação é caracterizada pela presença de neutrófilos e proteínas no exsudato, no entanto, no endotélio ocorre vasodilatação, aumenta da permeabilidade vascular e a estagnação do sangue (SZMITKO et al., 2003).

Muitas doenças humanas são caracterizadas por uma inflamação crônica, tais como colite ulcerativa, artrite reumatóide, aterosclerose, doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC), anemia falciforme (AF) e também algumas dermatites como psoríase ou algumas vasculites. Nessas doenças não-infecciosas, os neutrófilos desempenham um papel crucial no tecido danificado, entretanto, um recrutamento excessivo de células inflamatórias ou ativação de células inapropriadas leva ao desenvolvimento de inflamação crônica e favorece a fibrose e, mais tardiamente, a perda da função orgânica (WEISS et al., 1989).

1.3.0 A inflamação na aterosclerose e na anemia falciforme:

1.3.1 Aterosclerose

A aterosclerose é considerada uma doença vascular que envolve múltiplos fatores, como o estreitamento das artérias, o desenvolvimento de placas estáveis e instáveis, dependendo do grau de deposição de lipídios e de inflamação. Esta doença inflamatória crônica se caracteriza pela formação de placas, consistindo em células espumosas, células imunes, células endoteliais vasculares, células musculares lisas, plaquetas, matriz extra-celular e lipídeos (GALKINA & LEY, 2007). A doença apresenta um desenvolvimento dinâmico e presença de elementos característicos nas diferentes fases do processo.

Contudo, marcadores específicos de uma determinada fase e sua correlação com as alterações estruturais decorrentes da doença, ainda encontram-se em estudo. Os diferentes estágios são caracterizados por meio de evidências estruturais e da expressão de fatores indicadores ou marcadores nas lesões (LUSIS et al., 2004).

Atualmente, acredita-se que o endotélio lesado pelo acúmulo de lipoproteínas de baixa densidade oxidada (LDLox) leva a ativação do endotélio que, por sua vez, expressa as moléculas de adesão e libera mediadores da resposta imunológica (RODRIGUEZ et al., 2009). Os riscos dessa doença são aumentados por vários fatores, tais como diabetes, hipertensão, dislipidemia, obesidade e tabagismo (ROSS, 1999).

1.3.2 Anemia falciforme

A anemia falciforme é causada pela mutação de ponto envolvendo a troca do aminoácido - ácido glutâmico pela valina na sexta posição da cadeia polipeptídica da globina- β , levando conseqüentemente a produção de uma hemoglobina anômala- Hb S (HbS) (STUART & NAGEL, 2004). A HbS quando desoxigenada tem a capacidade de formar polímeros e causar deformação, enrijecimento e fragilidade das células vermelhas, ocasionando diminuição da vida média das hemácias, fenômenos vaso-oclusivos, episódios de dor e lesão de órgãos-alvo (STEINBERG, 1999; KAUL & FABRY, 2004; HEBBEL, 2000; KAUL, et al., 2009).

A vaso-oclusão é o resultado de um processo complexo, que envolve interações entre os diferentes tipos celulares, incluindo: hemácias normais, hemácias falcizadas, células endoteliais ativadas, leucócitos e fatores do plasma (DE FRANCHESCHI & CORROCHER, 2004). É um evento multifatorial que ocorre principalmente em órgãos onde a tensão de oxigênio é baixa e o fluxo sanguíneo é lento. Sabe-se que células brancas sanguíneas podem aderir à outras células, como hemácias falcizadas ou não, plaquetas e à parede do vaso sanguíneo, exercendo um papel importante no desenvolvimento da vaso-oclusão (OKPALA, 2006). A vaso-oclusão é considerada a maior causa de morbidade e mortalidade nos pacientes com anemia falciforme (JOHNSON & TELEN, 2008).

1.4.0 Recrutamento dos leucócitos aos tecidos

Os leucócitos migram por diapedese através da monocamada endotelial e da membrana basal para os tecidos. Isto é um processo complexo e ainda pouco compreendido e envolve extensos mecanismos moleculares. O recrutamento dos leucócitos para o foco inflamatório inicia-se com a migração de leucócitos. Este processo inicia-se com a captura e o rolamento dos leucócitos ao longo do endotélio intermediado inicialmente por proteínas de superfície celular da família das selectinas e seus ligantes, durante o repouso ou sob condições inflamatórias (ROSEN & BERTOZZI, 1994). Após a migração transendotelial e o extravasamento dentro dos tecidos, os leucócitos recebem novos sinais, frequentemente na forma de gradientes de quimiocinas, para continuar o processo de recrutamento para o local de inflamação (TARRANT & PATEL, 2006; LORENOWICZ et al., 2007), com a finalidade de evitar a propagação da infecção, por exemplo, enquanto uma resposta imune é montada (SCHEIRMANN et al., 2010).

Para que o rolamento dos neutrófilos ocorra no endotélio acontecem interações rápidas e reversíveis entre as moléculas de adesão conhecidas como selectinas, sendo que as P e E selectinas são expressas pelas células endoteliais e a L selectina expressa pelos neutrófilos.

O rolamento dos neutrófilos nas vênulas pós-capilares é predominantemente intermediado pela P-selectina, que interage com a glicoproteína ligante de P-selectina (PSGL-1) expressa constitutivamente nos neutrófilos (SUNDD et al., 2011). Os tipos de interações envolvidas na captura de leucócitos são geralmente fracas, permitindo o rolamento ao longo do endotélio. No momento do rolamento, as quimiocinas são responsáveis por enviar sinais que convertem a baixa afinidade das ligações para alta afinidade, o que ocasionará a parada e iniciará o processo de firme adesão ao endotélio mediado pelas integrinas (LUSTER, 1998).

As integrinas são moléculas de adesão celular transmembrana do tipo I que consistem de duas subunidades não-covalentemente associadas: α e β , que são responsáveis por intermediarem interações entre células e patógenos, célula-célula, célula e matrix extracelular (ZARBOCK & LEY, 2008). As mais relevantes para a migração leucocitária são a família das β_2 integrinas, especialmente as integrinas LFA-1, Mac-1 e as duas α_4 integrinas $\alpha_4\beta_1$ (VLA-4) e $\alpha_4\beta_7$, sendo estas últimas pouquíssimo expressas em neutrófilos. Estas moléculas são encontradas usualmente em um estado inativo nos leucócitos e não são capazes de ligar aos seus ligantes, mas tornam-se ativas após estímulos levando as integrinas a adotarem uma conformação de alta afinidade (TARRANT & PATEL, 2006).

Em casos de danos vasculares ou processos inflamatórios ocorre o aumento da expressão das selectinas e integrinas, posteriormente, ocorrendo a firme adesão e migração dos leucócitos (GOLIAS et al., 2007).

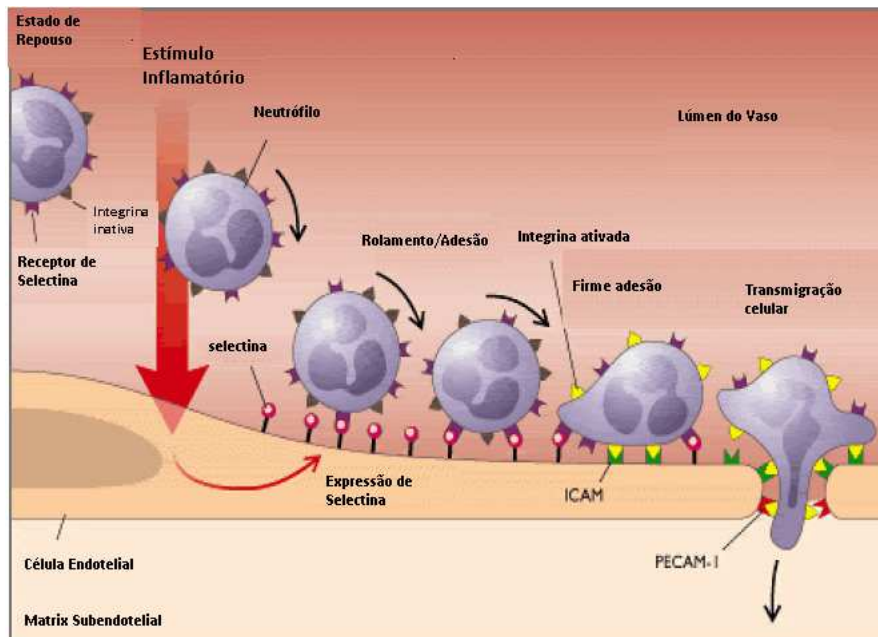


Figura 1: Ativação e emigração celular do neutrófilo na inflamação (ETZIONI, 2001). Nas proximidades de uma lesão inflamatória, os neutrófilos aderem-se à parede endotelial, deixam os vasos sanguíneos e movimentam-se ativamente em direção ao foco inflamatório. Este processo envolve várias dezenas ou centenas de moléculas, que são ativadas e desativadas sequencialmente ou movimentadas em diferentes regiões da célula. A ligação e rolamento dessas células à camada endotelial são intermediados pelas L e P-selectinas enquanto que a firme adesão da célula é intermediada principalmente pelas $\beta 2$ integrinas, Mac-1 e LFA-1, sendo o principal ligante dessas integrinas o ICAM-1.

1.5.0 Interações celulares e sinalização na inflamação

1.5.1 Moléculas de adesão e integrinas:

As moléculas de adesão são divididas em 4 grupos, sendo: 1º) a família das imunoglobulinas (Ig SF), que inclui moléculas de adesão vascular (VCAM-1), intercelular (ICAM-1), moléculas de adesão às mucosas (MadCAM) e endotelial-plaque

tária (PECAM); 2º) a família das proteoglicanas, que podem ligar-se aos componentes da matriz extracelular; 3º) a família das selectinas, que incluem a L-selectina (nos leucócitos), E-selectina (no endotélio) e P-selectina (nas plaquetas); 4º) a família das integrinas presentes nos leucócitos e eritrócitos (GOLIAS et al., 2007).

A ICAM-1 é expressa nos monócitos, nas células endoteliais, linfócitos, eosinófilos, queratinócitos, células dendríticas, células do fígado e nos fibroblastos. Os ligantes mais importantes para o ICAM-1 são as integrinas β_2 (GOLIAS et al., 2007). Três outras ICAMs são: ICAM-2, ICAM-3 e ICAM-4. A VCAM-1 é expressa na superfície do endotélio ativado e vários tipos celulares, incluindo fibroblastos da medula óssea, macrófagos e células dendríticas, e o seu ligante principal é a integrina VLA-4.

As integrinas são proteínas heterodímeras de superfície celular, constituída por duas cadeias polipeptídicas α e β , que atuam como mediadoras no processo inflamatório, exercendo um papel importante na adesão de leucócitos, quimiotaxia, fagocitose, adesão endotelial e agregação (ZARBOCK & LEY, 2008). As integrinas são constituídas de inúmeras subfamílias e todos os membros dessas famílias possuem, em comum, uma cadeia β e uma cadeia α singular. Atualmente, são conhecidas 16 subunidades α e 8 subunidades β , e existem várias combinações entre essas subunidades. Devido a essas combinações, já são descritos 20 diferentes tipos de integrinas, subclassificados dentro de 8 famílias estruturalmente distintas (YUSUF-MAKAGIANSAR et al., 2002).

As integrinas β_1 (CD29) (subfamília VLA) exercem um papel fundamental na adesão, sinalização de moléculas e migração de células durante a embriogênese. A subfamília VLA é constituída de 6 membros VLA-1 (CD49a/CD29), VLA-2 (CD49b/CD29), VLA-3 (CD49c/CD29), VLA-4 (CD49d/CD29), VLA-5 (CD49e/CD29) e VLA-6 (CD49f/CD29), que são distribuídas em diferentes tecidos e interagem predominantemente com as proteínas da matrix extracelular, como laminina, colágeno e fibronectina (YUSUF-MAKAGIANSAR et al., 2002).

A VLA-4 exerce sua função ancorando a célula ao endotélio, por se ligar ao VCAM-1 (molécula de adesão vascular). Os leucócitos expressam também a subfamília β_2 , que inclui a LFA-1 (CD11a/CD18) e Mac-1 (CD11b/CD18) (DE CLERK et al., 1995).

O receptor endotelial, *intercellular adhesion molecule* (ICAM-1) é o principal ligante das integrinas Mac-1 e LFA-1, as quais também têm afinidade por outros ligantes encontrados na matrix extracelular, tais como fibronectina (FN), iC3b e fibrinogênio (ASSIS et al., 2004).

As selectinas são uma família de 3 lectinas do tipo C que ligam-se fracamente aos seus ligantes de carboidratos na superfície dos leucócitos, sendo responsável pelo rolamento na superfície endotelial (VESTWEBER, 1996). As selectinas são predominantemente, embora não exclusivamente, expressas nas células pelos quais são denominadas: L (leucócito), E (endotélio) e P (plaqueta), também recebem outra denominação, sendo CD62L, CD62E e CD62P, respectivamente. As L-selectinas estão expressas na maioria dos leucócitos, com exceção do subtipo de células T de memória, e são responsáveis pela ligação dos leucócitos ao endotélio tanto *in vitro* quanto *in vivo*.

1.6.0 Neutrófilos

Os neutrófilos são produzidos e armazenados na medula óssea, sendo posteriormente liberados para o sangue periférico onde sua meia-vida é de aproximadamente sete horas. A produção dos neutrófilos ocorre a partir de células progenitoras multipotenciais, sob ação de inúmeros mediadores, tendo como principais, os fatores estimuladores de colônias de granulócitos (G-CSF) e monócitos (GM-CSF) (ZAGO et al., 2004).

A principal característica da inflamação é representada pelo recrutamento extracelular de células inflamatórias. As células predominantes são os neutrófilos, que estão presentes tanto nos processos inflamatórios que ocorrem como consequência de invasão tecidual por microorganismos como aquelas decorrentes de distúrbios imunes ou tecidos lesados (HENSON et al., 1987). Os neutrófilos constituem a primeira linha de defesa do organismo contra infecções bacterianas.

O entendimento da ativação neutrofilica, e sua sinalização e recrutamento, é importante na identificação de alvos para a inibição seletiva de funções específicas de neutrófilos sem afetar outras funções importantes (ZARBOCK & LEY, 2008). Em doenças não-infecciosas, os neutrófilos desempenham um papel fundamental no tecido danificado, entretanto, um excesso de células inflamatórias ou ativação de células inapropriadas no sítio da inflamação leva ao desenvolvimento de uma inflamação crônica, favorecendo a fibrose e posteriormente a perda da função orgânica (WEISS et al., 1989).

1.6.1 Mecanismos de adesão de leucócitos e seu papel em doenças inflamatórias

A adesão dos neutrófilos à parede vascular tem importante significância em doenças inflamatórias, como na anemia falciforme. Na doença falciforme, após encontrar um estímulo inflamatório, os leucócitos são recrutados para o endotélio ativado da vênula pós-capilar e subsequentemente formam interações adesivas com os eritrócitos circulantes. Outras interações adesivas ocorrem entre o endotélio com células vermelhas, leucócitos e plaquetas, ocasionando uma ativação multicelular que resulta na liberação de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias, tornando-se um ciclo repetitivo de ativação celular e produção de moléculas inflamatórias, proporcionando um estado inflamatório crônico (CONRAN et al., 2009). Em seguida, os eritrócitos falcizados aderem às células imobilizadas na parede vascular, levando a redução do fluxo sanguíneo e finalmente à vaso-oclusão (TURHAN et al., 2002; FRENETTE, 2002). O entendimento das moléculas que intermedeiam este processo e os estímulos inflamatórios que o desencadeiam é muito importante.

1.6.2 Os eritrócitos

Os eritrócitos não são conhecidos como células com alta capacidade de adesão ao endotélio, porém sob certas condições estas células aderem-se mais facilmente. Hemácias imaturas, por exemplo, demonstram uma expressão maior das moléculas de adesão como a VLA-4 na sua superfície (ESHGHI et al., 2008) e estas células consequentemente demonstram uma maior capacidade adesiva.

No momento não é bem compreendido o papel da inflamação nas propriedades adesivas de hemácias, no entanto hemácias de pacientes com anemia falciforme apresentam propriedades adesivas aumentadas (GAMBERO et al., 2007). Ainda é desconhecido o motivo desta adesão aumentada nesses pacientes, sugere-se que esse aumento deve-se à imaturidade das células vermelhas ou ao estado inflamatório (CONRAN et al., 2009).

1.6.3 Mecanismos de adesão das hemácias

Os eritrócitos podem aderir ao endotélio vascular usando as moléculas de adesão CD36 e integrina VLA-4 entre outras moléculas de adesão. As integrinas são proteínas de superfície celular, constituídas por duas cadeias polipeptídicas α e β , que atuam como mediadores do processo inflamatório, exercendo um papel importante nas etapas de adesão leucocitária, quimiotaxia, fagocitose, adesão endotelial e por fim, agregação. Moléculas ligantes para VLA-4 incluem VCAM-1 e fibronectina da matrix extracelular (CARLOS et al., 1994). Reticulócitos falciformes demonstram um aumento da aderência à células endoteliais estimuladas com TNF numa interação intermediada pela VLA-4 e VCAM-1 (SWERLICK et al., 1993).

O CD36 é um receptor de adesão não pertencente à família das integrinas que se liga com uma variedade de proteínas da matrix extracelular. Este receptor intermedeia a adesão da integrina $\alpha_v\beta_3$ ao endotélio vascular via trombospondina (CONFORTI et al., 1992). A expressão de CD36 é maior em células imaturas da linhagem eritróide (GREENWALT et al., 1992; OKUMURA et al., 1992). Acredita-se que CD36 e estas interações com trombospondina, são mecanismos potenciais pelos quais receptores de adesão podem contribuir para a vaso-oclusão na anemia falciforme (STYLES et al., 1997).

1.6.4 Plaquetas

As plaquetas são pequenos fragmentos discóides, anucleares, que são produzidas pelos megacariócitos que circulam na corrente sanguínea (VARGA-SZABO et al., 2008). As plaquetas são produzidas através de um processo de proliferação e diferenciação celular que ocorre em um período denominado megacariocitopoese, que ocorre no interior da medula óssea (LOURENÇO et al., 2001).

As plaquetas circulam por aproximadamente 10 dias na corrente sanguínea antes de serem eliminadas por macrófagos no baço e no fígado. Durante o seu tempo de vida, as plaquetas podem aderir à parede vascular. A firme adesão das plaquetas ocorre quando a camada de células endoteliais é danificada por lesões ou quando há alterações patológicas, tais como os encontrados na aterosclerose (VARGA-SZABO et al., 2008).

Na membrana plasmática das plaquetas, existem receptores, como os complexos de glicoproteínas, da família das integrinas, com domínios extracelulares, transmembrana e citoplásmico que permitem a sua ativação durante a agregação, ocasionando a mudança da sua forma discóide para projeções da membrana plasmática e liberação do conteúdo dos grânulos intraplaquetários. As plaquetas possuem grânulos, sendo: os grânulos alfa que contêm fibrinogênio, fibronectina, fatores V e VIII, fatores de crescimento e os corpúsculos eletrodensos ou grânulos densos, responsáveis por armazenar adenosina difosfato (ADP), adenosina trifosfato (ATP), cálcio ionizado, histamina, serotonina e adrenalina. As plaquetas desempenham um papel fundamental em eventos vasculares, como no infarto agudo do miocárdio e no acidente vascular encefálico (AVE) pois quando ativadas podem também aderir ao endotélio, como ocorre nas trombozes (LEVI, 2005). A ativação plaquetária é considerada um processo fisiológico fundamental para a manutenção da função hemostática plaquetária (KULKARNI, 2000).

Nosso grupo de pesquisa mostrou que as plaquetas de indivíduos com anemia falciforme possuem uma capacidade aumentada de aderirem ao endotélio vascular e à componentes da matriz extracelular, o que pode contribuir com os processos de vaso-oclusão, facilitando a acumulação de leucócitos no endotélio e a liberação de fatores plaquetários que podem estimular ainda mais a inflamação no local (PROENÇA et al., 2010).

1.6.5 Mecanismo de adesão das plaquetas

O mecanismo de adesão das plaquetas envolve o sequestro celular no local da lesão tecidual através da interação de quatro receptores sinérgicos: a glicoproteína GPIb/IX (CD42b/CD42a) presente em plaquetas, a integrina $\alpha_2\beta_1$ (GPIa/IIa; CD49b/CD41a), ligante para o colágeno, a integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$ (GPIIb/IIIa; CD41a/CD61), ligante para o fibrinogênio e a integrina $\alpha_5\beta_1$ (GPIc/IIIa; CD51/CD61), ligante para a fibronectina (RUGGERI, 2002). Os fatores moleculares que levam a interação da plaqueta ao endotélio ainda não são completamente conhecidos (GAWAZ, et al., 2005). O contato das plaquetas com o endotélio é intermediado pelas selectinas (KIERZENBAUM, 2004).

A P-selectina (CD62P), encontrada em plaquetas e células endoteliais é expressa na superfície endotelial como mediadora da circulação de plaquetas nas arteríolas e vênulas durante o processo inflamatório (FRENETTE et al., 1995, 1998) e é expressa na superfície de plaquetas após a sua ativação. A PSGL-1 (ligante 1 para a glicoproteína P-selectina) é responsável por ativar plaquetas ou células endoteliais (KARGHAN et al., 2006), sendo primeiramente identificada nos leucócitos (KANSAS, 1996). Para uma adesão estável é necessário um contato adicional entre as plaquetas e o endotélio, sendo então intermediado pelas integrinas $\alpha_{IIb}\beta_3$ (KASIRER-FRIEDE et al., 2002) e $\alpha_2\beta_1$ (NIESWANDT e WATSON, 2003; KAHN, 2004), que são as principais mediadoras de superfície que estabilizam a adesão em células hematopoiéticas (RUGGERI, 2002).

A $\alpha_{IIb}\beta_3$ é a glicoproteína mais abundante na superfície das plaquetas, o seu número varia de 60.000 a 80.000 cópias por célula. Essa integrina mostra afinidade para os ligantes fibrinogênio, fibronectina e vWF, sendo altamente modulado na ativação que intermedeia a adesão das plaquetas, a agregação e formação de trombo (RUGGERI, 2002). Além das integrinas $\alpha_{IIb}\beta_3$ e $\alpha_2\beta_1$, existem outras integrinas, como $\alpha_5\beta_3$, $\alpha_5\beta_1$ (VLA-5) e $\alpha_6\beta_1$ (VLA-6) expressas na superfície das plaquetas (SUZUKI et al., 1986; KAMATA et al., 2005).

1.6.6 O papel do endotélio na inflamação

O endotélio vascular desempenha um papel chave na regulação das respostas inflamatórias. As moléculas de adesão, tais como as selectinas, receptores de imunoglobulina, integrinas e caderinas, participam de diversas interações durante a inflamação. Em circunstâncias normais, são responsáveis por intermediarem as interações entre as células endoteliais e a matrix extracelular (GOLIAS et al., 2007).

A expressão das moléculas de adesão na superfície se encontra alterada durante o processo inflamatório. Subsequentemente, os receptores participam da interação entre os leucócitos e o endotélio ativado, no processo de ativação dos leucócitos e extravasamento. O endotélio vascular atua como uma barreira que regula as trocas entre o sangue periférico e os tecidos, desempenhando um papel importante na regulação da permeabilidade transcapilar, no controle da proliferação de células hematopoiéticas e nas respostas inflamatórias (GOLIAS et al., 2007).

O endotélio ativado provoca um aumento na expressão das moléculas de adesão, tais como as selectinas, molécula de adesão celular vascular (VCAM-1) e a molécula de adesão intercelular (ICAM-1), promovendo a aderência dos monócitos, de células inflamatórias, neutrófilos, linfócitos, macrófagos, recrutamento de citocinas adicionais, fatores de crescimento e metaloproteinases (SPRAGUE & KHALIL, 2009).

1.7.0 Moléculas inflamatórias: Citocinas e quimiocinas

As citocinas são um grupo de diversas proteínas solúveis produzidas por células do sistema imunológico (SPRAGUE & KHALIL, 2009). Diferentes tipos de células podem secretar as citocinas e uma mesma citocina pode atuar em vários tipos de célula (pleiotropia) e produzir múltiplas atividades biológicas, dependendo do tipo de célula e o contexto no qual esta inserida (OZAKI et al., 2002). Também podem atuar de forma sinérgica (duas ou mais citocinas atuando em conjunto) ou antagonisticamente (causando atividades opostas). Exemplos de citocinas são a TNF-alfa, fatores estimuladores de colônias, interferons, interleucinas, monocinas e quimiocinas (SPRAGUE & KHALIL, 2009).

As quimiocinas são citocinas quimiotáticas que regulam a migração e adesão dos leucócitos do sangue para os tecidos, a produção de novas citocinas, além de auxiliarem na diferenciação celular (ABBAS & LITCHMAN, 2005). São citocinas formadas por peptídeos estruturalmente relacionados de 8-10 kD, que atuam no movimento direcional dos neutrófilos para o desenvolvimento da inflamação, fazendo com que ocorra o aumento na capacidade adesiva das integrinas e promovendo o acúmulo de células inflamatórias no sítio da inflamação. O grupo das quimiocinas, com aproximadamente 50 quimiocinas e 20 receptores, são similares na sequência de aminoácidos e ligam-se a receptores contendo 7 domínios transmembrana. São subdivididos dentro de famílias, de acordo com a estrutura N-terminal dos resíduos de cisteína em: C, CC, CXC ou CX3C (TARRANT & PATEL, 2006).

1.7.1 Interleucina-8 (IL-8)

A interleucina 8 (IL-8) é uma quimiocina, ativamente secretada pelas células endoteliais nos locais de inflamação; esta proteína provoca a modificação da conformação das integrinas na superfície do neutrófilo, promovendo sua ligação com as moléculas receptoras na superfície das células endoteliais, como a molécula ICAM-1. A IL-8 aumenta a capacidade do neutrófilo de lisar bactérias pela intensificação da fagocitose, geração de superóxido e liberação de grânulos (ZAGO *et al.*, 2004).

Além disso, a IL-8 desencadeia a firme adesão do neutrófilo à célula endotelial (LUM *et al.*, 2004), promove sua migração para os tecidos e ativa localmente o seu mecanismo efector (MUKAIDA, 2000). A produção dessa quimiocina é regulada pela IL-1 e TNF-alfa, que são os principais estímulos para a produção de quimiocinas (SCHROEDER *et al.*, 1996).

1.7.2 Fator de necrose tumoral α

O TNF- α , assim como outras citocinas, possui efeitos pró-inflamatórios aumentando as propriedades quimiotáticas, a aderência de neutrófilos ao endotélio vascular, e estimulando a produção de radicais livres e a síntese de outros mediadores inflamatórios como IL-1 e PGE₂. A principal função fisiológica do fator de necrose tumoral (TNF- α) é estimular o recrutamento de neutrófilos e monócitos para os sítios de infecção. Essa citocina é produzida pelos macrófagos ativados, linfócitos ou monócitos. O TNF- α intermedeia esses efeitos por diversas ações sobre as células endoteliais vasculares e sobre os leucócitos, sendo capaz de alterar as propriedades anticoagulantes do endotélio, estimulando a produção de fator de ativação de plaquetas, podendo levar ao aumento da adesão celular ao endotélio (PATHARE *et al.*, 2003). Esta citocina pró-inflamatória faz com que as células endoteliais vasculares expressem moléculas de adesão, que tornam a superfície endotelial adesiva para os leucócitos, inicialmente para os neutrófilos e subsequentemente para os monócitos e linfócitos. O TNF- α também estimula as células endoteliais e os macrófagos a secretarem quimiocinas. Além do seu papel na inflamação, o TNF- α induz a apoptose de alguns tipos celulares (CLARK, 2007). Essa citocina parece apresentar grande importância em diversas doenças inflamatórias que incluem, anemia falciforme, artrite reumatóide, e doenças crônicas, onde essa molécula participa provavelmente da super regulação da cascata de citocinas responsáveis pela inflamação (LANARO *et al.*, 2009 ; VERRI Jr *et al.*, 2010 ; TAYLOR *et al.*, 2000).

1.8.0 Mediadores inflamatórios e seu papel na ativação celular

1.8.1 As proteínas CD40L e LIGHT

O CD40L (TNFSF5 ou CD154), é uma proteína transmembrana de 39-kDa expressa na superfície de plaquetas, de células endoteliais, neutrófilos, monócitos e macrófagos, células T e B e células dendríticas (RIZVI et al., 2008). Essa proteína exerce um efeito pró oxidante (URBICH *et al.*, 2002), tem a capacidade de estimular plaquetas, o endotélio e os neutrófilos a produzirem ROS (CHAKRABARTI et al., 2005; VANICHAKARN et al., 2008), e sua interação com o receptor CD40 induz à resposta inflamatória, favorecendo o aparecimento da aterogênese (ANTONIADES *et al.*, 2009); essa interação do CD40L-CD40 promove a produção de citocinas, quimiocinas e fatores angiogênicos pelas células endoteliais (MARLIES *et al.*, 2003).

Vários estudos mostraram o papel do CD40L como molécula sinalizadora dos processos envolvidos na aterosclerose em diferentes estágios, compreendendo fases de: início, evolução e complicações agudas após a ruptura da placa. Tais evidências foram relacionadas ao fato de que a ligação entre CD40 e CD40L induz a expressão das metaloproteinases que degradam o colágeno intersticial e a capa fibrosa das placas de ateromas, levando a instabilidade da placa e sua ruptura (SHOENBECK et al., 2001 ; ANTONIADES et al., 2009). O CD40L desempenha um papel chave na aterotrombose por intermediar a ligação entre as plaquetas, inflamação, trombose e aterogênese (ANTONIADES et al., 2009).

O LIGHT (TNFSF14 ou CD258) é uma proteína transmembrana pertencente à família do fator de necrose tumoral (TNF). Essa proteína não só apresenta um papel crucial no sistema imunológico, como também é importante na regulação da aterogênese. O LIGHT é capaz de promover o aumento da expressão de quimiocinas (IL-8 e MCP-1) e moléculas de adesão (E-selectina e VCAM-1) nas células endoteliais (CHANG et al., 2002). Estudos tem demonstrado, que a via de indução relacionada a aterosclerose, é a via do receptor do LIGHT, o *herpes virus entry mediator* (HVEM; SANDBERG et al., 2009), e que esta citocina exerce sua atividade biológica através da ativação do NF- κ B (GRANGER et al., 2003).

Suas funções são complexas, devido à interações com os receptores distintos, o HVEM e/ou o *lymphotoxin b receptor* (LTBR) (WEI et al., 2006). O HVEM apresenta uma ampla distribuição nos tecidos, especialmente em tecidos linfóides, linfócitos do sangue periférico, células dendríticas e monócitos (MOREL *et al.*, 2000; ZOU & HU, 2005). O LTBR é expresso na maioria dos tipos celulares; as atividades biológicas da sinalização de LIGHT- LTBR, incluem a indução de apoptose e produção de várias citocinas (CHANG *et al.*, 2002). Estudos em animais demonstram que o LIGHT é importante para o desenvolvimento de várias doenças auto-imunes como por exemplo, artrite reumatóide (SANDBERG et al., 2009).

Estudos recentes demonstraram a expressão elevada do LIGHT e seu receptor HVEM nas células espumosas das placas ateroscleróticas (LEE *et al.*, 2001). Além disso, o LIGHT é responsável pela indução de citocinas pro - aterogênicas, como TNF- α , IL-8, matrix de metaloproteinases, em monócitos (WEI *et al.*, 2006). Foi demonstrado que o LIGHT está envolvido na regulação da homeostasia de lipídeos (SHOLZ *et al.*, 2005 ; SANDBERG et al., 2009). A interação entre as citocinas inflamatórias e as células endoteliais é uma etapa crítica na aterogênese, levando à uma disfunção endotelial e a inflamação dentro da lesão aterosclerótica, promovendo o recrutamento adicional de células inflamatórias para a parede do endotélio (KINLAY *et al.*, 2001; SANDBERG et al., 2009).

1.9.0 Justificativa

Nosso grupo demonstrou que as citocinas inflamatórias CD40L e LIGHT são produzidas pelas plaquetas e são liberados para o plasma em indivíduos com anemia falciforme. Tendo em vista que essas citocinas inflamatórias estão envolvidos nos processos de estresse oxidativo, inflamação e doenças vasculares, se faz necessário uma melhor elucidação de um possível papel do CD40L e LIGHT na indução das propriedades adesivas dos neutrófilos, eritrócitos e plaquetas. Estes dados podem ser importantes para desvendar o papel destas citocinas na inflamação que contribui para a evolução de doenças inflamatórias como a anemia falciforme e aterosclerose.

2. Objetivos

2.1 Objetivos gerais

O objetivo deste trabalho é a investigação dos efeitos das proteínas inflamatórias CD40L e LIGHT nas propriedades adesivas de neutrófilos, hemácias e plaquetas de indivíduos saudáveis e a elucidação do papel destas proteínas inflamatórias como mediadores do processo inflamatório.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliação das propriedades adesivas dos neutrófilos, hemácias e plaquetas após estimulação com as proteínas CD40L ou LIGHT, utilizando-se o ensaio de adesão estática.
- Avaliação da participação das moléculas de adesão na adesão de neutrófilos após estímulo com as proteínas CD40L ou LIGHT.
- Avaliação da expressão de CD40L e LIGHT e dos seus receptores, CD40, LT β R e HVEM, na membrana plasmática de neutrófilos, hemácias e plaquetas, utilizando-se a técnica de citometria de fluxo.
- Avaliação da expressão das moléculas de adesão (ou subunidades das moléculas de adesão) CD62P, CD41a, CD49b nas plaquetas estimuladas com CD40L e LIGHT, utilizando-se a técnica de citometria de fluxo.

3. Aspectos Éticos

3.1 Aspectos éticos da pesquisa

Este projeto de pesquisa foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Faculdade de Ciências Médicas (FCM) da UNICAMP e aprovado sob o nº 603/2010, homologado em 27 de julho de 2010. O Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) deste estudo foi aprovado pelo conselho citado e todos os participantes deste estudo o assinaram. O TCLE encontra-se na parte final, no capítulo de anexos.

4. Materiais e Métodos

4.1.1 Materiais

Para os ensaios de adesão estática foram utilizadas as proteínas recombinantes CD40L (CD154) e o LIGHT (TNFSF14), ambos da R&D Systems, Inc., Minneapolis, EUA. Nos ensaios de citometria de fluxo utilizou-se a IL-8 recombinante humana (CXCL8) e o TNF- α , todos obtidos da R&D Systems (Minneapolis, USA) e as drogas utilizadas nos ensaios de adesão estática. Para os ensaios utilizando os inibidores das funções das integrinas CD11a e CD11b foi utilizado os anticorpos monoclonais anti-CD11a e anti-CD11b, ambos obtido da AbD SEROTEC, Oxford, Reino Unido.

Para as avaliações das expressões proteicas de CD40L e LIGHT e seus receptores (CD40, LT β R e HVEM), foram utilizados os anticorpos monoclonais, Anti-CD40L (TNFRSF5) conjugado com APC, Anti-CD40 (TNFRSF5) conjugado com PE, LT β R (TNFRSF3) conjugado com PE, Anti-HVEM (TNFRSF14) conjugado com APC – todos os anticorpos foram obtidos da R&D Systems (Minneapolis, EUA). Para a avaliação das moléculas de adesão dos neutrófilos foram utilizados anticorpos, anti-CD11b e anti-CD62L, obtidos da BD Pharmingen (California, EUA) e anti-CD11a obtido da AbD serotec (North Caroline, EUA).

Para avaliação das moléculas de adesão das plaquetas foram utilizados o anti-CD41a conjugado com FITC (clone PM6/248), anti-CD49b – FITC (clone AK7), anti-CD62P – FITC (clone AK6) e o anticorpo PAC-1 – FITC que reconhece a integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$ na sua conformação de alta afinidade, sendo todos da Becton Dickison, San Jose, CA, EUA.

4.2.1 Sujeitos da pesquisa

Sangue periférico foi colhido de indivíduos saudáveis (masculino e feminino), idade entre 18 e 55 anos, que estiveram sem o uso de aspirina (ácido acetil salicílico) e antiinflamatórios por pelo menos 10 dias.

4.3.1 Separação de neutrófilos

Sangue total (7mL) foi colhido em tubo contendo o anticoagulante citrato de sódio 3,2% (VACUTAINER®, BD, Brasil), utilizando o método descrito por English e Andersen (1974). Em síntese, estas amostras foram colocadas sobre 2 camadas de Ficoll-Paque de densidades 1.119 e 1.077 g/L, respectivamente. Após a centrifugação de 700g por 30 minutos, a camada dos neutrófilos foi retirada com uma pipeta de *Pasteur*, e os neutrófilos lavados em solução de salina tamponada (PBS, pH 7.4). Após centrifugação (250g, 10 min, 4°C), as células foram resuspendidas em solução de amônia (155mM NH₄Cl, 10mM KHCO₃) para lisar os eritrócitos contaminantes. Os neutrófilos foram lavados mais uma vez com PBS e ressuspendidos em meio RPMI 1640 (pH 7.2) numa concentração de 2x10⁶ células/mL. As células foram mantidas à 4°C até o prosseguimento do experimento.

4.4.1 Contagem dos neutrófilos no sangue periférico

A contagem das células foi feita através de uma câmara de Neubauer. As células foram diluídas para a concentração desejada do experimento (2x10⁶ células/mL). A contagem de neutrófilos foi realizada aliquotando 180µl da suspensão original de células e 20µl de solução de Turk, ambos adicionados em *eppendorf*. Em seguida, foram adicionados 10µl da suspensão de células na câmara de Neubauer. A contagem de neutrófilos foi feita nos quatro quadrantes externos e multiplicado por 50.000.

4.5.1 Preparação de lâminas em citocentrífuga

Após a separação, 100 µL da suspensão de células de cada amostra foram utilizadas para a preparação de uma lamina para a posterior contagem diferencial das células. A amostra foi colocada no recipiente da citocentrífuga (Shandon Cytospin 3, Lipshaw Inc; Pittsburgh, Pennsylvania, U.S.A.) e submetida a centrifugação a 400 rpm durante 5 minutos. Em seguida, as lâminas foram coradas com solução de Leishman (Sigma Chemical Company, ST, Louis, Mo) e a porcentagem de neutrófilos na amostra foi calculada após visualização em microscopia óptica comum. Amostras foram utilizadas somente quando a pureza de neutrófilos foi maior de 97%.

4.6.1 Teste de viabilidade celular

Após a separação, a viabilidade celular foi avaliada misturando-se 10µl da suspensão de células; 140µl de meio RPMI e 50µl de azul de tripan (Triplan blue / Merck, Frankfurter, Alemanha). As células foram observadas pelo microscópio óptico, sendo descartadas amostras com viabilidade inferior a 90%.

4.7.1 Ensaio de adesão estática de neutrófilos *in vitro*

Os ensaios de adesão foram realizados em placas com 96 poços recém preparados por *coating* individual nos poços com 60µl de fibronectina (20 µg/mL de FN em PBS; SIGMA-ALDRICH, St. Louis, MO, USA) ou 60 µl de ICAM-1 (10 µg/mL de ICAM-1 em PBS; R&D Systems, Inc., Minneapolis, USA), *overnight* à 4 °C. Após o *coating*, os poços da placa foram lavados três vezes com PBS antes de bloquear os sítios inespecíficos de cada poço com PBS/BSA 0.5% por 60 minutos a 37°C. A placa foi lavada mais três vezes com PBS antes de colocar a placa para secar. Os neutrófilos em suspensão foram previamente incubados (30 minutos) com ou sem as citocinas (LIGHT, CD40L, IL-8 ou TNF-α) de interesse (e/ou na presença de anticorpos bloqueadores) e imediatamente semeados nos poços da placa. As células foram incubadas nas placas por 30 minutos a 37°C, 5% de CO₂. Após a incubação, as células não aderidas foram lavadas duas vezes com PBS. Em seguida, foram adicionados 50 µl de meio de cultura RPMI 1640 nos poços onde foi realizado o ensaio de adesão.

Para mensurar a percentagem das células da suspensão original que aderiram à FN ou ICAM-1, foi realizada uma curva padrão de células da suspensão original. Para construir a curva, foram adicionados concentrações que variavam de 0-100% da suspensão original de células (2x10⁶ células/mL) em 50µl de RPMI. As placas foram congeladas por ao menos 12 horas, e posteriormente foi medido o conteúdo de mieloperoxidase (MPO) encontrado tanto nas células da curva padrão como nas células aderidas do ensaio (BRADLEY et al., 1982); após o descongelamento da placa, foi adicionado 100 µl/poço de HTAB (*hexadecil trimetil amônio*) , após a homogeneização, foi retirado 20 µl/poço desta mistura e colocado em outra placa.

Por fim, adicionou-se 180 µl de uma solução previamente preparada contendo 45 mL de água, 5 mL de tampão fosfato de potássio, 8,35mg de dicloridrato de *o*-dionisidina dihydrochloride e 25µl H₂O₂ 1%. Após 5 minutos, foi realizada a leitura da placa de adesão através do Leitor de Elisa a 492nm (Multiscan MS, Labsystems, EUA). A porcentagem de células aderentes foi calculada por comparação das absorbâncias das amostras desconhecidas com às da curva padrão. Ensaios foram feitos em triplicata para cada tratamento foram utilizados 10 indivíduos para cada experimento.

4.8.1 Separação de células vermelhas

Amostras de sangue periférico foram coletadas em tubos com citrato de sódio e centrifugadas por 10 minutos a 500g para remoção do plasma e *buffy coat*. As células foram lavadas por 3 vezes em PBS (Salina fosfatada tamponada) e centrifugadas a 700g, 600g e 480g respectivamente, sendo então, ressuspensas em 1mL de PBS para contagem de células vermelhas no contador automático Cell-Dyn 1700 (ABBOT, IL, EUA). A concentração final foi ajustada para 4×10^8 cél/mL em meio Hank's Balanced Salt Solution (HBSS; GIBCO BRL, Life Technologies).

4.9.1 Ensaio de adesão estática de células vermelhas *in vitro*

Placas com 96 poços foram preparadas por *coating* individual de cada poço com 60 µL de fibronectina (20µg/mL de FN em PBS; SIGMA-ALDRICH, St. Louis, MO, EUA) *overnight* à 4°C. Os poços da placa foram lavados por três vezes com 100µL de PBS. Os sítios inespecíficos foram bloqueados com 150µL de PBS/BSA a 1% por 90 minutos à 37°C. Subsequentemente, os poços foram lavados novamente por mais três vezes com 100µL de PBS. As hemácias em suspensão foram previamente incubadas com ou sem as citocinas (LIGHT e CD40L) de interesse e imediatamente semeados (50µL de 2×10^8 cél/mL em triplicata) nos poços da placa preparada. A incubação foi realizada por um tempo de 30 minutos à 37°C, 5% CO₂.

Após a incubação, os poços foram lavados ligeiramente por três vezes com 100µL de PBS, para que as células não aderentes fossem desprezadas. Por fim, foram colocados 50µL de meio HBSS em cada poço de células.

Para mensurar a quantidade de células vermelhas que aderem à FN, realizamos uma curva padrão. Para construir a curva, adicionamos em duplicata, concentrações crescentes em relação da suspensão inicial de células (2×10^8 células/mL), onde 0 continha apenas meio HBSS e 100% possuía a suspensão original de células. Foram adicionados 50µL da solução de DRABKIN (Sigma Chem. Co., St Louis, EUA) em cada poço para mensuração de hemoglobina. Após 5 minutos de incubação à 37°C, a leitura da placa foi realizada em leitor de ELISA à 540 nm (Multiscan MS, Labsystems, EUA). A aderência foi calculada por comparação da absorbância das amostras desconhecidas com a absorbância da curva padrão que apresenta concentrações celulares conhecidas.

4.10.1 Separação de plaquetas

Amostras de sangue periférico (12 ml) foram coletadas em tubos contendo o anticoagulante citrato de sódio (3,2%) e ácido cítrico-dextrose (ACD). As amostras foram centrifugadas por 20 min, à 200g à 21°C. O plasma rico em plaquetas (PRP) foi transferido para um tubo *falcon* (15 ml), ao qual foi adicionado um tampão de lavagem (140 mM NaCl / 0.5 mM KCl / 12 mM citrato de sódio / 10 mM glicose / 12.5 mM sacarose, pH 6), na proporção de 5:7 (5 partes de PRP para 7 partes de tampão), e centrifugado por 12 min, 800 g à 21°C. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* de plaquetas foi ressuspensionado delicadamente (a fim de evitar ativação plaquetária) com 500 µl 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). As plaquetas foram contadas no contador automático Cell-Dyn 1700 (ABBOT, IL, EUA), e a concentração de plaquetas foi ajustada para $1,2 \times 10^8$ plaquetas/ml em solução de Krebs.

4.11.1 Ensaio de adesão estática de plaquetas *in vitro*

O ensaio de adesão estático foi realizado de acordo com Bellavite, et al. (1994), com algumas adaptações. A concentração padronizada de fibrinogênio (FB) como ligante foi de 50µg/mL, (50µL/poço). Placas com 96 poços foram preparadas por *coating* individual com 50µg/mL de fibrinogênio (Calbiochem, La Jolla, CA, EUA e foram incubadas *over night* à 4°C. Os poços foram lavados duas vezes com 200µL/poço de solução de Krebs com 1% de BSA (LGCBio, Brasil) por 60 minutos à 37°C. As placas foram lavadas novamente como descritas anteriormente, e os ensaios de adesão foram realizados em triplicata; adicionando-se 50µL/poço da suspensão de plaquetas ($1,2 \times 10^8$ plaquetas/mL) (pré-incubadas com CD40L ou LIGHT por 30 minutos, 37°C em tubos eppendorf) em cada poço e incubando à placa por 30 minutos à 37°C. Para cada amostra foi preparada uma curva padrão em placas não semeadas com FB, em duplicata com diluições a partir da suspensão original de plaquetas ($1,2 \times 10^8$ plaquetas/mL); 5%, 10%, 20%, 50% e 100%. Após a incubação, as plaquetas não aderente foram desprezadas lavando-se a placa mais duas vezes como descrito anteriormente. Foram adicionados 50µL/poço de tampão de Krebs na placa do ensaio, e 150µL/poço do substrato de fosfatase ácida (0.1 M tampão citrato; pH 5.4; 5mM p-fosfato de nitrofenila e 0.1% de Triton X-100, Sigma), nas placas do ensaio e da curva padrão, e incubou-se por 1 h a temperatura ambiente (TA). Ao final da incubação a reação foi interrompida adicionando-se 100µL/poço de NaOH (2N). A absorbância de cada poço foi obtida em um leitor de ELISA no comprimento de onda de 405 nm (Multiscan MS, Labsystems, EUA), e a adesão foi calculada em porcentagem de plaquetas aderidas a partir da comparação das absorbâncias dos poços da curva padrão, formada por diluições da suspensão original de plaquetas.

4.12 Citometria de fluxo

4.12.1 Citometria de fluxo – avaliação dos neutrófilos

A expressão das moléculas de adesão (LFA-1, Mac-1 e CD62-L) na superfície dos neutrófilos foi avaliada por citometria de fluxo.

Os neutrófilos isolados (1×10^6 células/mL) foram incubados com o anticorpo monoclonal anti-CD11a (3 μ l; AbD serotec; North Caroline, EUA) conjugado ao fluorocromo PE, anticorpo monoclonal anti-CD11b conjugado ao fluorocromo Alexa Fluor 488 (3 μ l; BD Pharmingen; California, EUA) e/ou anticorpo monoclonal anti-CD62L (3 μ l; BD Pharmingen; California, EUA) conjugado ao fluorocromo PE. Após incubar as células com os anticorpos por 30 minutos a 4°C, foram adicionados 500 μ L de PBS em cada tubo e em seguida as células foram centrifugadas (250g, 5 minutos). O sobrenadante foi removido após a centrifugação e as células foram fixadas com paraformaldeído (1%) e mantidas a 4°C até o momento da análise. As células foram analisadas a 488nm utilizando um citômetro FACScalibur Becton-Dickinson. *Dot plots* SSC/FSC (*side scatter/forward scatter*) foram usados para identificar a população de neutrófilos. A intensidade de fluorescência de cada neutrófilo foi comparada com neutrófilos incubados com um controle negativo de isotipo IgG₁ (AbD SEROTEC, Reino Unido) conjugado com FITC. Os resultados foram expressos como média de intensidade de fluorescência (MIF) que demonstra a média da quantidade, em unidades de fluorescência, da subunidade de integrinas e da selectina expressa na superfície de cada célula, relativa às células incubadas com o anticorpo controle negativo. Os resultados também foram expressos em porcentagem (%) de células positivas para cada marcador celular.

A expressão das proteínas (CD40L e LIGHT) e seus receptores CD40, LT β R e HVEM na membrana plasmática de neutrófilos, foi avaliada conforme descrito acima. Os neutrófilos foram incubados com 3 μ l de anti-CD40L (TNFRS5) conjugado com APC, 3 μ l de anti-CD40 (TNFRSF5) conjugado com PE, 3 μ l de anti-LT β R (TNFRSF3) conjugado com PE, e ou 3 μ l de anti-HVEM (TNFRSF14) conjugado com APC por 30 minutos ao abrigo de luz – todos os anticorpos foram obtidos da R&D Systems (Minneapolis, EUA). Em outros ensaios, os neutrófilos foram estimulados por 30 minutos com TNF- α (10, 50 e 200ng/mL) e IL-8 (10, 200 e 500ng/mL) antes da incubação com os anticorpos. Em alguns, os neutrófilos foram estimulados com CD40L e LIGHT por 30 minutos e 2 horas e foi avaliada a expressão dos receptores CD40, LT β R e HVEM. Toda a técnica foi realizada conforme descrito anteriormente.

4.12.2 Citometria de fluxo – avaliação das hemácias

Nas hemácias foram avaliadas a expressão das proteínas CD40L e LIGHT e seus receptores CD40, LT β R e HVEM. Sangue periférico (4,5 mL) foi coletado em tubo contendo EDTA, 5 μ L de sangue total foi adicionado a cada tubo de citometria e foram adicionados 95 μ L de PBS. Em seguida, as amostras foram incubadas com 3 μ L de cada anticorpo monoclonal, anti-CD40L (TNFRSF5) conjugado com APC, anti-CD40 (TNFRSF5) conjugado com PE, LT β R (TNFRSF3) conjugado com PE, anti-HVEM (TNFRSF14) conjugado com APC – todos os anticorpos foram obtidos da R&D Systems (Minneapolis, EUA). Decorrido os 30 minutos, foram adicionados 500 μ L de PBS e as células foram centrifugadas à 150g por 5 minutos. O sobrenadante foi desprezado e as células foram ressuspensas em 500 μ L de PBS. As células foram analisadas a 488nm utilizando-se um citômetro FACScalibur Becton-Dickinson. *Dot plots* SSC/FSC (*side scatter/forward scatter*) foram usados para identificar a população de hemácias. O número de eventos analisados foi de 10.000. A intensidade de fluorescência de cada hemácia foi comparada com hemácias incubadas com um controle negativo de isotipo IgG₁ (AbD SEROTEC, Reino Unido) conjugado com FITC. Os resultados foram expressos em % de células positivas para cada marcador celular.

4.12.3 Citometria de fluxo - avaliação das plaquetas

Nas plaquetas foram avaliadas as expressões superficiais das moléculas CD41a (subunidade α da integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$, receptor de fibrinogenio), CD49b (subunidade α da integrina $\alpha_2\beta_1$, receptor de colágeno), CD62P (P-selectina), além de avaliação da ativação da integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$. Amostras de sangue periférico (9 ml) foram coletadas em tubos contendo o anticoagulante citrato de sódio (3,2%) e ácido cítrico-dextrose (ACD). As amostras foram centrifugadas por 20 min, 200g à 21°C. O PRP (5 μ L, 1×10^8 Plq/mL) foi fixado com 200 μ L de solução de PBS (pH 7,4) com 1% de paraformaldeído por 10 minutos. Em seguida, as plaquetas foram lavadas com 2mL de PBS e centrifugadas por 15 minutos à 1800 rpm (21°C). Desprezou-se o sobrenadante e as plaquetas foram ressuspensas em 45 μ L de PBS e adicionou-se 5 μ L do anticorpo correspondente, e incubado por 20 minutos protegido da luz em temperatura ambiente.

Os anticorpos utilizados foram o anti-CD41a conjugado com FITC (clone PM6/248), anti-CD49b – FITC (clone AK7), anti-CD62P – FITC (clone AK6) e o anticorpo PAC-1 – FITC que reconhece a integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$ na sua conformação de alta afinidade, sendo todos da Becton Dickson, CA, EUA. Em seguida, as plaquetas foram novamente lavadas como descrito anteriormente. Ao final, o sobrenadante foi desprezado e as plaquetas foram ressuspensas em 300 μ l de PBS, e as amostras foram analisadas à 488nm no FACScalibur (Becton Dickson, CA, EUA). Foram adquiridos 10.000 eventos para cada amostra. Os *dot plots* SSC/FSC (*side scatter/forward scatter*) foram utilizados para a identificação das populações de plaquetas. A intensidade de fluorescência de cada plaqueta foi comparada com plaquetas incubadas com um controle negativo de isotipo IgG₁ (AbD SEROTEC, Reino Unido) conjugado com FITC. Os resultados foram expressos como média de intensidade de fluorescência (MIF) que demonstra a média da quantidade, em unidades de fluorescência, da subunidade de integrinas e da selectina expressa na superfície de cada célula, relativa às células incubadas com o anticorpo controle negativo. Os resultados também estão expressos em (%) de células positivas para cada marcador celular.

4.13 Análise Estatística

Os resultados foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média (EPM).

Foi utilizado o teste t pareado para as comparações entre dois grupos (com/sem estímulo);

Foi utilizado o teste de ANOVA “*repeated measures*” seguido do teste Bonferroni Multiple Comparisons Test, para comparação entre mais de dois grupos de tratamento;

Foi utilizado o teste de Dunnett’s Multiple Comparison Test, para comparações de uma mesma amostra, porém em concentrações diferentes de droga.

Valores de $p < 0.05$ foram considerados estatisticamente significante.

5. RESULTADOS

5.1.1 Efeitos das citocinas inflamatórias CD40L e LIGHT na adesão estática de neutrófilos, utilizando a fibronectina como ligante.

Neutrófilos (2×10^6 céls/mL) de indivíduos saudáveis foram pré-incubados com as citocinas CD40L (10, 50 ou 100 ng/mL) ou LIGHT (10, 50 ou 100 ng/mL) (30 min, 37°C, a 5% CO₂) e subsequentemente a sua capacidade de aderir ao ligante FN foi avaliada utilizando ensaios de adesão (20µg/mL FN, 30 min, 37°C, a 5% CO₂). Foi verificado que o CD40L (50ng/mL) estimulou um aumento estatisticamente significativo ($P < 0.01$) na adesão de neutrófilos para FN. Quando os neutrófilos foram estimulados com LIGHT, foi observado um aumento na adesão para o FN, sendo que este aumento foi significativo para a concentração de 100ng/ml ($P < 0.01$) (Figura 2).

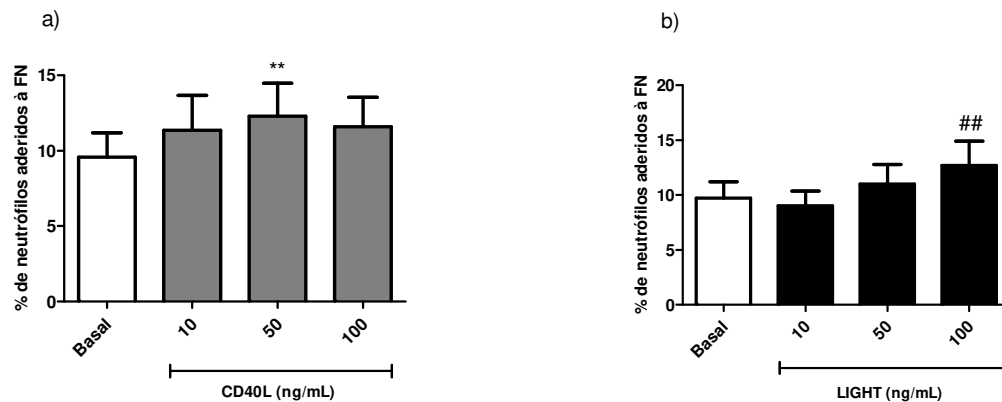


Figura 2: Efeito do CD40L e LIGHT na adesão dos neutrófilos a fibronectina (FN) (A) CD40L (10, 50 e 100ng/mL), n=10 e (B) LIGHT (10, 50 e 100ng/mL), n=11. Neutrófilos foram pré-incubados com as citocinas por 30 minutos à 37°C, em estufa a 5% CO₂, posteriormente incubadas em placas previamente cobertas com FN (20µg/mL) (30 min, 37°C, 5% CO₂). Resultados expressos em média $\pm$ erro padrão da média. **, $P < 0.01$, comparados ao basal; ##, $P < 0.01$, comparado ao basal. Determinado por ANOVA (*repeated measures*), seguido por *Dunnnett's Multiple Comparison Test*.

5.1.2 Efeitos das citocinas inflamatórias CD40L e LIGHT na adesão estática de neutrófilos, utilizando ICAM-1 como ligante.

Os neutrófilos (2×10^6 céls/mL) de indivíduos saudáveis foram pré-incubados com as citocinas CD40L (10,50 e 100 ng/mL) ou LIGHT (10,50 e 100 ng/mL) (30 min. 37°C, a 5% CO₂) e subsequentemente a sua capacidade de aderir ao ligante ICAM-1 foi avaliada utilizando ensaios de adesão (10 µg/mL ICAM-1, 30 min 37°C, a 5% CO₂). Foi verificado que o CD40L estimulou um aumento estatisticamente significativo ($P < 0.01$) na adesão de neutrófilos para ICAM-1 na concentração de 50 ng/mL. Quando os neutrófilos foram estimulados com LIGHT, foi observado um aumento na adesão para ICAM-1, sendo que este aumento foi significativo para as concentrações de 50 e 100 ng/ml ($P < 0.05$) (Figura 3).

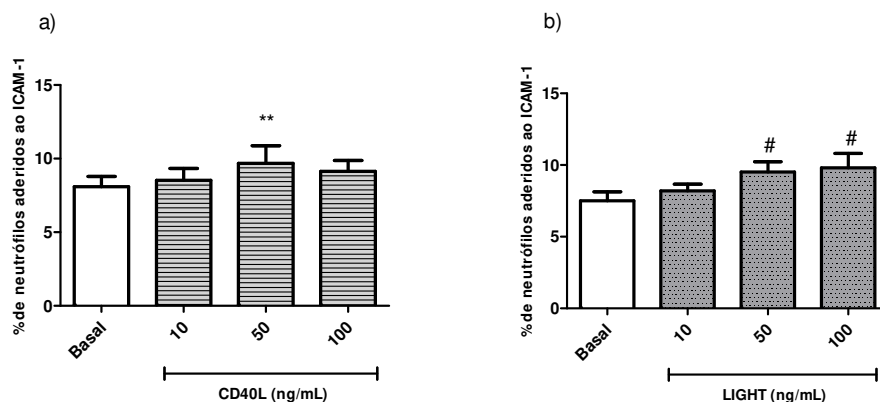


Figura 3: Efeito do CD40L e LIGHT na adesão dos neutrófilos para ICAM-1 recombinante (A) CD40L (10, 50 e 100ng/mL), n=6 e (B) LIGHT (10, 50 e 100ng/mL), n=8. Neutrófilos foram pré-incubados por 30 minutos à 37°C, em estufa a 5% CO₂, e posteriormente colocados em placas previamente cobertas com ICAM-1 (10µg/mL). Resultados expressos em média $\pm$ erro da média. **, $P < 0.01$, comparado ao basal; #, $P < 0.05$, comparado com adesão basal. Determinado por ANOVA (*repeated measures*), seguido por *Dunnett's Multiple Comparison Test*.

5.1.3 Adesão de neutrófilos à fibronectina após estímulo com as citocinas inflamatórias CD40L e LIGHT: efeito de anticorpos inibidores das integrinas LFA-1 e Mac-1.

A Figura 4 mostra a adesão dos neutrófilos pré-incubados (30 min. 37°C, a 5% CO₂) com CD40L (50ng/mL) ou LIGHT (100ng/mL) na presença dos anticorpos inibidores da função das integrinas anti-LFA-1(20µg/mL) ou anti-Mac-1 (20µg/mL) e depois submetidos ao ensaio de adesão, utilizando a FN como ligante (30 min, 37°C, a 5% CO₂). Foi verificado que os anticorpos anti-LFA-1 e anti-Mac-1 diminuíram significativamente a adesão dos neutrófilos na presença do CD40L e do LIGHT (Figura 4).

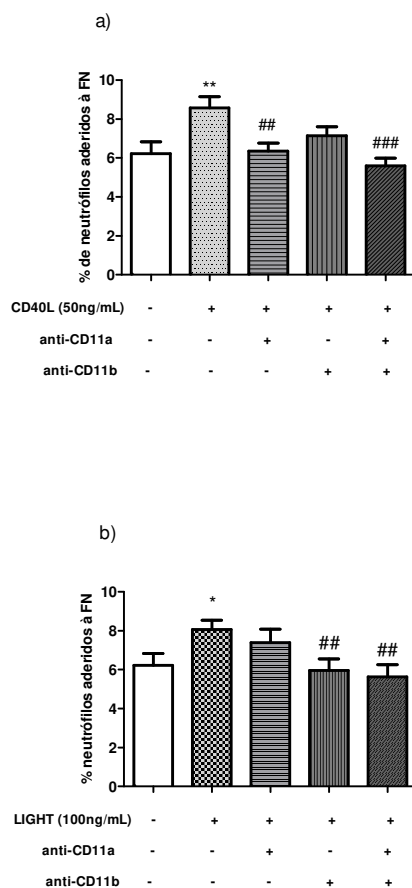


Figura 4: Efeito dos anticorpos bloqueadores de Mac-1 e LFA-1 na adesão dos neutrófilos a FN, após estímulo com (A) CD40L (50ng/mL) e (B) LIGHT (100ng/mL). (n=5). Neutrófilos foram pré-incubados com o CD40L ou LIGHT na presença dos anticorpos (20µg/ml) por 30 minutos à 37°C, em estufa a 5% CO₂, posteriormente colocados em placas previamente cobertas com FN (20µg/mL). Resultados expressos em média ± erro da média. Determinado por *repeated measures ANOVA*, seguido por teste Bonferroni. **, P< 0.01, comparado com adesão basal, ##, P<0.01, comparado com CD40L, ###, P<0.001, comparado ao CD40L; . *, P< 0.05, comparado com basal, ###, P< 0.001, comparado com LIGHT.

5.1.4 Adesão de neutrófilos ao ICAM-1 após estímulo com as citocinas inflamatórias CD40L e LIGHT: efeito dos anticorpos inibidores das integrinas LFA-1 e Mac-1.

A Figura 5 apresenta a adesão dos neutrófilos após pré-incubação (30 min, 37°C, a 5% CO₂) com CD40L (50ng/mL) ou LIGHT (100ng/mL) na presença dos anticorpos inibidores da função das integrinas anti-LFA-1 (20µg/mL) ou anti-Mac-1 (20µg/mL) e depois submetidos ao ensaio de adesão utilizando o ICAM-1 como ligante. Foi verificado que os anticorpos anti-LFA-1 e anti-Mac-1, diminuíram significativamente a adesão dos neutrófilos na presença do CD40L e do LIGHT.

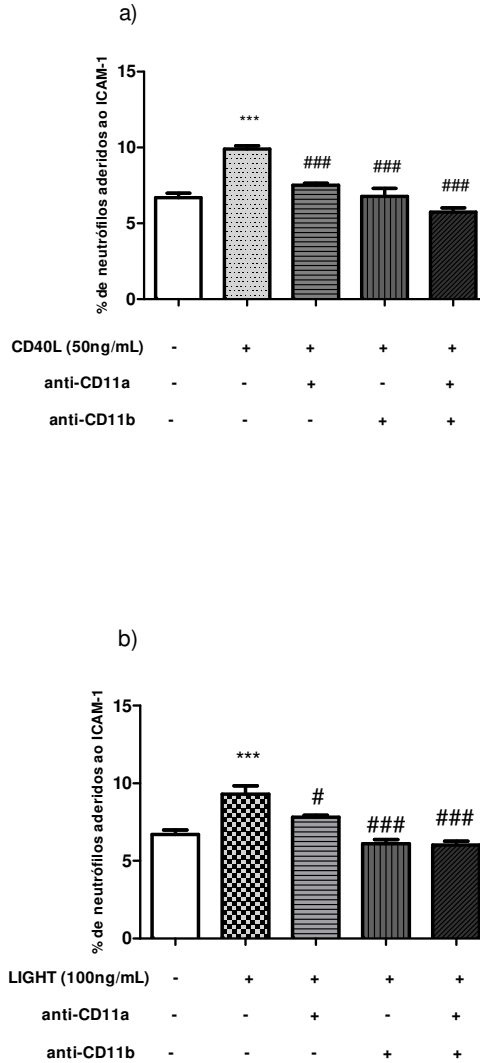


Figura 5: Efeito dos anticorpos bloqueadores de Mac-1 e LFA-1 na adesão dos neutrófilos para ICAM-1 recombinante, após estímulo com (A) CD40L (50ng/mL), (B) LIGHT (100ng/mL), n=5. Neutrófilos foram pré-incubados com o CD40L ou LIGHT na presença dos anticorpos (20µg/ml) por 30 minutos à 37°C, em estufa a 5% CO₂, posteriormente colocados em placas previamente cobertas com ICAM-1 (10µg/mL). Resultados expressos em média ± erro da média. ***, P< 0.001, comparado com adesão basal; ###, P<0.001, comparado com CD40L, **, P< 0.001, comparado com basal; #, P<0.05, comparado ao LIGHT; ###, P<0.001, comparado ao LIGHT. Determinado por ANOVA (*repeated measures*), seguido por teste *Bonferroni*.

5.1.5 Efeitos das citocinas inflamatórias CD40L e LIGHT nas propriedades adesivas de hemácias.

As células vermelhas isoladas de indivíduos saudáveis foram pré-incubadas (30 min. à 37°C, a 5% CO₂) com concentrações variadas de CD40L (10,50 e 100ng/ml) e LIGHT (10, 50 e 100 ng/mL) e depois submetidas ao ensaio de adesão (30 min. à 37°C, a 5% CO₂), utilizando a fibronectina como ligante. A adesão de hemácias à FN aumentou significativamente nas concentrações de 10,50 e 100ng/mL de CD40L (P<0.05; P<0.01; P<0.001), respectivamente, e o LIGHT aumentou a adesão de hemácias significativamente nas concentrações de 50 e 100 ng/mL (P<0.05 e P<0.01), respectivamente (Figura 6).

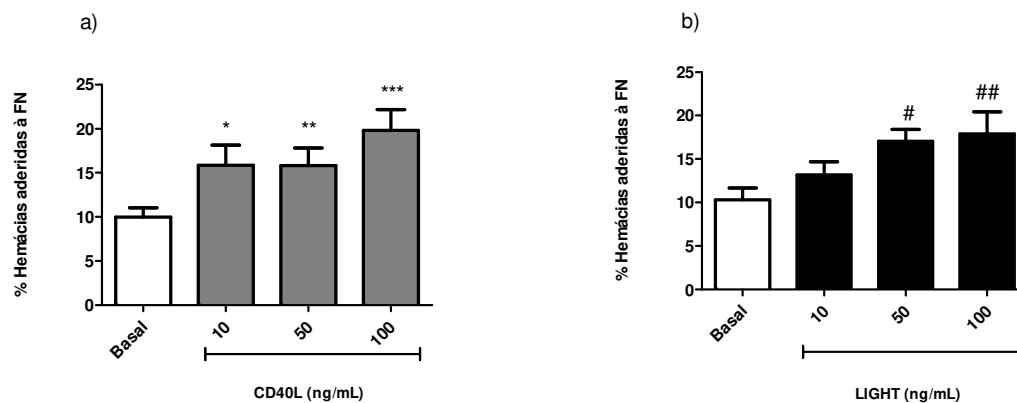


Figura 6: Efeitos de CD40L e LIGHT nas propriedades adesivas das hemácias de indivíduos saudáveis (A) CD40L (10, 50 e 100ng/mL), n=14 e (B) LIGHT (10, 50 e 100ng/mL), n=9. Hemácias foram pré-incubadas por 30 minutos com as citocinas à 37°C, em estufa a 5% CO₂, posteriormente colocadas em placas previamente cobertas com FN (20µg/mL) (30 min 37°, 5% CO₂). Resultados expressos em média ± erro da média. *P<0.05 comparado ao basal; **P<0.01 comparado ao basal; ***P<0.001 comparado ao basal; #, P<0.05, comparado ao basal; ##, P<0.01, comparado ao basal Determinado por ANOVA (*repeated measures*), seguido por *Dunnett's Multiple Comparisons Test*.

5.1.6 Efeitos das citocinas inflamatórias CD40L e LIGHT nas propriedades adesivas de plaquetas, utilizando fibrinogênio como ligante.

Plaquetas ($1,2 \times 10^8$ plts/mL) foram pré-incubados com as citocinas CD40L (10,50 e 100 ng/mL) ou LIGHT (10,50 e 100 ng/mL) (30 min. à 37°C, a 5% CO₂) e posteriormente a sua capacidade de aderir ao ligante FB foi avaliada utilizando ensaios de adesão (50µg/mL FB, 15 min 37°C, a 5% CO₂). Foi verificado que tanto a citocina CD40L quanto a LIGHT não alteraram as propriedades adesivas das plaquetas, sob as condições utilizadas ($P > 0.05$) (Figura 7).

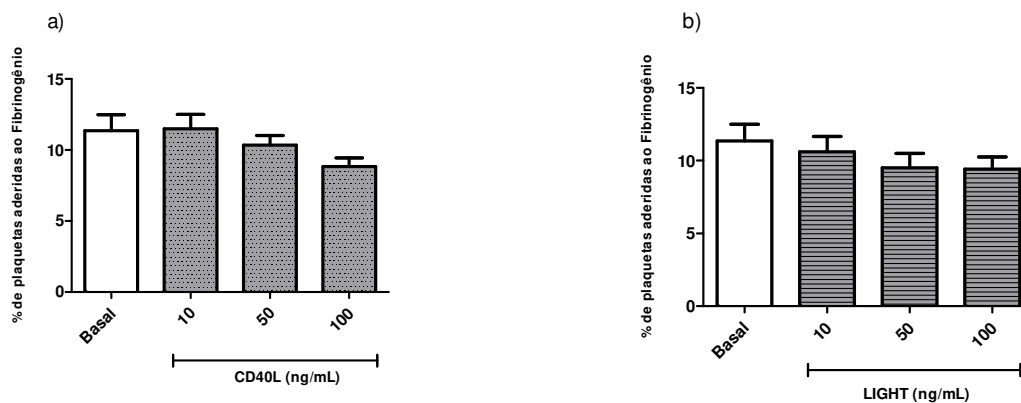


Figura 7: Efeito das citocinas inflamatórias nas propriedades adesivas das plaquetas de indivíduos saudáveis (A) CD40L (10, 50 e 100ng/mL), n=6 e (B) LIGHT (10, 50 e 100ng/mL), n=6. Plaquetas foram pré-incubadas com as citocinas por 30 minutos à TA, posteriormente colocadas em placas previamente cobertas com fibrinogênio FB (50µg/mL). Resultados expressos em média ± erro da média. $P > 0.05$ para todos os grupos comparados ao basal.

5.1.7 Expressão das proteínas (CD40L e LIGHT) e seus receptores (CD40) e (LTβR e HVEM) na superfície de neutrófilos, hemácias e plaquetas.

A expressão das proteínas CD40L, LIGHT, CD40 (receptor do CD40L), LTβR e HVEM (receptores do LIGHT), na superfície de neutrófilos foi determinado por citometria de fluxo. Foi verificado que os neutrófilos apresentam, uma expressão baixa de CD40L e do seu receptor CD40 na sua superfície (Tabela 1), no entanto a expressão de LIGHT na superfície dos neutrófilos foi maior, bem como a expressão do seu receptor, o LTβR. O receptor HVEM foi encontrado expresso na superfície dos neutrófilos mas com intensidade menor. Foi verificado que as hemácias expressam as proteínas CD40L e LIGHT e os seus receptores em um nível muito baixo (Tabela 1). embora essas expressam o CD40 (receptor de CD40), de uma forma elevada. Há uma expressão dos receptores LTβR e HVEM na superfície das plaquetas mas essa expressão é relativamente baixa (Tabela 1).

5.1.8 Efeitos do CD40L e LIGHT na expressão das integrinas Mac-1 e LFA-1 e da L-selectina, na superfície de neutrófilos, determinado por citometria de fluxo

Os neutrófilos foram separados do sangue total e pré-incubados com CD40L (10,50 e 100ng/mL, 30 min. ou 2 horas), LIGHT (10,50 e 100ng/mL, 30 min. e 2 horas) ou TNF-α (10, 50 e 200ng/mL). Posteriormente, os neutrófilos foram incubados por 30 minutos à 4°C com os anticorpos anti-CD11b (Mac-1 subunidade α), anti-CD11a (LFA-1 subunidade α) ou anti-CD62L (L-selectina). Os resultados foram expressos como média de intensidade de fluorescência por célula (MFI; Tabelas 2 e 3), pois a expressão de CD11a, CD11b e CD62L é muito alta nos neutrófilos (expressão basal nos neutrófilos foi de $99.9 \pm 0.01\%$, $99.8 \pm 0.3\%$ e $92.4 \pm 2.2\%$, respectivamente). Foi verificado que o tratamento com CD40L (10ng/mL) provocou um aumento pequeno, mas significativo, na expressão da CD11a, comparado ao basal, após tratamento por 30 min ($P < 0.05$), Tabela 2.

No entanto, não foi verificado nenhuma alteração na expressão proteica de CD11b na superfície dos neutrófilos após tratamento com 10-100ng/ml CD40L (30min e 2 horas). Adicionalmente, foi verificado que a expressão da molécula CD62L na superfície dos neutrófilos diminuiu significativamente ($P<0.01$) 2 horas após da incubação com o CD40L (10 -100ng/mL), conforme apresentado na Tabela 2. A incubação dos neutrófilos com a LIGHT não provocou nenhuma alteração significativa na expressão proteica de CD11b e CD11a. No entanto, foi verificada uma diminuição significativa na expressão de CD62L na superfície dos neutrófilos após tratamento LIGHT 50ng/mL por duas horas de ($P<0.05$) (Tabela 3).

A incubação dos neutrófilos com TNF- α (10,50 e 200ng/mL) por 30 minutos foi utilizado como controle positivo para demonstrar que esta citocina induz a expressão da molécula CD11b nestas células. Foi verificado um aumento significativo na expressão proteica de CD11b quando os neutrófilos foram estimulados com TNF- α 10 e 50 e 200ng/mL ($P<0.05$) (Tabela 4).

5.1.9 Efeito das citocinas inflamatórias, TNF- α e IL-8, na expressão dos receptores CD40 e LT β R/HVEM na superfície de neutrófilos, determinado por citometria de fluxo

Os neutrófilos foram separados do sangue total e pré-incubados com TNF- α (10,50 e 200ng/mL, 30 min) ou IL-8 (10, 200 e 500ng/mL), por 30 minutos à 37°C, 5% de CO₂. Posteriormente, os neutrófilos foram incubados por 30 minutos à 4°C com os anticorpos (anti-CD40, anti-LT β R, anti-HVEM). Foi verificado que o TNF- α e a IL-8 não alteram a expressão das proteínas CD40, LTBR e HVEM na superfície de neutrófilos (Tabela 5).

5.1.10 Efeitos de CD40L e LIGHT na expressão dos receptores CD40, LT β R e HVEM na superfície de neutrófilos, determinado por citometria de fluxo

Os neutrófilos foram separados do sangue total e pré-incubados com CD40L (10,50 e 100ng/mL, 30 min. ou 2 horas), posteriormente, esses neutrófilos foram pré-incubados com o anticorpo anti-CD40. Foi verificado que a incubação de neutrófilos com a citocina CD40L (por 30 min ou 2 horas) não alterou a porcentagem de células que expressam o receptor CD40 na sua superfície (Tabela 6). Adicionalmente, após o estímulo dos neutrófilos com LIGHT (10,50 e 100ng/mL, 30 min. e 2 horas) não houve diferença na expressão dos receptores LT β R e HVEM na superfície das células (Tabela 6).

5.1.11 Efeitos de CD40L e LIGHT na expressão e atividade de moléculas de adesão na superfície das plaquetas

A expressão das principais moléculas de adesão das plaquetas foi determinada por citometria de fluxo na superfície de plaquetas. O PRP (5 μ l , 1 $\times$ 10⁸ PLTs/mL) foi incubado com CD40L ou LIGHT (10, 50 e 100ng/mL) por 30 min e depois fixado com 1% de paraformaldeído e depois as plaquetas foram lavadas e incubadas com o anticorpo de interesse (conforme descrito no item 4.11.3). Resultados foram expressos pela porcentagem de células positivas (%positiva $\pm$ SEM) e pela intensidade média de fluorescência (MFI) para cada plaqueta (Tabelas 7 e 8).

A expressão do CD41a (subunidade da α_{IIb}) não foi alterado após a incubação das plaquetas com a CD40L ou LIGHT (10,50 e 100ng/mL). O anticorpo PAC-1 reconhece a integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$ na sua conformação de alta afinidade; não houve nenhuma alteração na conformação da integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$ na superfície das plaquetas após estímulo com o CD40L ou LIGHT (Tabelas 7 e 8). A expressão da CD62P (P-selectina) na superfície das plaquetas não se alterou após o estímulo das plaquetas com CD40L ou LIGHT (Tabelas 7 e 8). A expressão da subunidade α_2 da integrina $\alpha_2\beta_1$ (CD49b) também não apresentou nenhuma alteração de expressão significativa após estímulo com o CD40L e LIGHT (Tabelas 7 e 8).

Proteína	% Neutrófilos Positivas	% Hemácias Positivas	% Plaquetas Positivas
CD40L	1.2±0.3	0.04±0.009	0.7±0.2
CD40	6.6±1.7	1.0±0.2	37.2±2.3
LIGHT	66.2±9.7	0.3±0.03	7.8±1.4
LTβR	24.1±6.5	0.4±0.1	6.2±1.3
HVEM	10.7±2.4	0.8±0.4	7.2±1.5

Tabela 1 – A expressão das proteínas **CD40L, CD40, LIGHT, LTβR e HVEM** na superfície dos neutrófilos (n=11), hemácias (n=5) e plaquetas (n=9), foi determinada por citometria de fluxo. Os resultados da expressão das proteínas e seus receptores estão representados pela média±erro padrão de porcentagem de células que expressam a proteína (% positiva).

CD40L							
Proteína	Basal	10ng/mL (30min.)	50ng/mL (30min.)	100ng/mL (30min.)	10ng/mL (2 horas)	50ng/mL (2 horas)	100ng/mL (2 horas)
	MFI	MFI	MFI	MFI	MFI	MFI	MFI
CD11a	5448±487.8	6067±648.6	5954±657.2	5854±634	5271±495.5	5613±574.2	5473±515.1
CD11b	8638±1735	8754±1735	8391±1572	8870±1766	6817±1392	7785±1533	6733±1248
CD62L	4425±932.4	4483±896.8	4313±1005	4515±1073	2515±710.3***	2701±576.9**	2748±648.8**

Tabela 2 - Efeito da citocina CD40L (10,50 e 100ng/mL) na expressão de (A) LFA-1, (B) MAC-1 e (C) L-selectina, na superfície de neutrófilos de indivíduos saudáveis. As células foram pré-incubadas com CD40L por 30 min. ou 2 horas à 37°C, 5%CO₂. Posteriormente, as células foram incubadas por 30 minutos à 4°C com os anticorpos específicos. A intensidade de fluorescência por célula (MFI) foi determinada pelos anticorpos (anti-LFA-1, n=8 anti-Mac-1, n=8 e anti-CD62L, n=11) em 10.000 eventos adquiridos, como descrito. Resultados foram apresentados como média ± SEM; *P<0.05, comparado com basal, **P<0.01, comparado ao basal, ***P<0.01, comparado ao basal. Determinado por ANOVA seguido por *Dunnett's*.

LIGHT							
Proteína	Basal	10ng/mL	50ng/mL	100ng/mL	10ng/mL	50ng/mL	100ng/mL
		(30min.)	(30min.)	(30min.)	(2 horas)	(2 horas)	(2 horas)
	MFI	MFI	MFI	MFI	MFI	MFI	MFI
CD11a	5106±401.6	5456±540.2	5496±453.1	5244±351.2	4963±413.8	4666±479.5	4975±435.6
CD11b	7367±1317	7016±1528	8229±1727	6851±1252	6130±961.2	5876±1192	6292±1188
CD62L	4425±932.4	4052±950.1	4489±967.2	4070±713.4	3182±765.2	2800±732.1*	3016±741

Tabela 3 - Efeito da citocina LIGHT (10,50 e 100ng/mL) na expressão de (A) LFA-1 , (B) Mac-1 e (C) L-selectina , na superfície de neutrófilos de indivíduos saudáveis. As células foram pré-incubadas com LIGHT por 30 min. ou 2 horas à 37°C, 5%CO₂. Posteriormente, as células foram incubadas por 30 minutos à 4°C com os anticorpos específicos.A intensidade de fluorescência por célula (MFI) foi determinada pelos anticorpos (anti-LFA-1, n=7 ,anti-Mac-1, n=7 e anti-CD62L, n=11) em 10.000 eventos adquiridos, como descrito. Resultados foram apresentados como média ± SEM; *P<0.05, comparado com basal. Determinado por ANOVA (*repeated measures*) seguido por *Dunnett's Multiple Comparisons*.

Proteína	TNF- α				IL-8		
	Basal	TNF10ng/mL	TNF50ng/mL	TNF200ng/mL	IL-8 10ng/mL	IL-8 200ng/mL	IL-8 500ng/mL
	MFI	MFI	MFI	MFI	MFI	MFI	MFI
CD11b	4778 $\pm$ 660.3	6608 $\pm$ 420.3**	7043 $\pm$ 586.4**	6606 $\pm$ 391.7**	5170 $\pm$ 383.1	6101 $\pm$ 451##	6099 $\pm$ 331.3##

Tabela 4: Efeito das citocinas TNF- α (10, 50 e 200ng/mL) e IL-8 (10, 200 e 500ng/mL) na expressão de CD11b na superfície de neutrófilos. As células foram pré-incubadas com TNF- α ou IL-8 por 30 min. 37°C, 5%CO₂. Posteriormente, as células foram incubadas por 30 minutos à 4°C com os anticorpos específicos. A intensidade de fluorescência por célula (MFI) foi determinada pelos anticorpos (anti-CD11b) em 10.000 eventos adquiridos, como descrito. Resultados foram apresentados como média $\pm$ SEM da média de intensidade de fluorescência para o antígeno. *P<0.05, comparado ao basal; **P<0.01, comparado ao basal; ##, P<0.01, comparado ao basal. (n=6). Determinado ANOVA (*repeated measures*), seguido por *Dunnett's Multiple Comparisons*.

<i>Proteína</i>	<i>Basal</i>	<i>10ng/mL</i>	<i>50ng/mL</i>	<i>200ng/mL</i>	<i>10ng/mL</i>	<i>200ng/mL</i>	<i>500ng/mL</i>
		<i>TNF-α</i>	<i>TNF-α</i>	<i>TNF-α</i>	<i>IL-8</i>	<i>IL-8</i>	<i>IL-8</i>
	%Céls. Positivas	%Céls. Positivas	%Céls. Positivas	%Céls. Positivas	%Céls. Positivas	%Céls. Positivas	%Céls. Positivas
CD40	9.9 $\pm$ 2.4	12.3 $\pm$ 3.4	9.7 $\pm$ 2.2	7.9 $\pm$ 1	10.9 $\pm$ 2.3	8.9 $\pm$ 2.1	9.9 $\pm$ 1.9
HVEM	13.4 $\pm$ 2.8	15.2 $\pm$ 3.2	12.8 $\pm$ 3.5	12.7 $\pm$ 4.3	15.2 $\pm$ 3	14.4 $\pm$ 2.7	14.9 $\pm$ 4
LTβR	35.1 $\pm$ 9.6	28.4 $\pm$ 9.6	24.8 $\pm$ 6	36.5 $\pm$ 10.7	31.5 $\pm$ 7.9	30.2 $\pm$ 8.6	28 $\pm$ 7.6

Tabela 5: Efeito das citocinas TNF- α (10, 50 e 200ng/mL) e IL-8 (10, 200 e 500ng/mL) nas expressões de CD40, LT β R e HVEM na superfície de neutrófilos. As células foram pré-incubadas com TNF- α ou IL-8 por 30 min. 37°C, 5%CO₂. Posteriormente, as células foram incubadas por 30 minutos à 4°C com os anticorpos específicos. A intensidade de fluorescência por célula (MFI) foi determinada pelos anticorpos (anti-CD40, anti-LTBR e anti-HVEM) em 10.000 eventos adquiridos, como descrito. Resultados foram apresentados como média $\pm$ SEM da porcentagem de células positivas para o antígeno. P>0.05 para todos os tratamentos (n=6). Determinado ANOVA (*repeated measures*), seguido por *Dunnett's*

%Céls. Positivas								
Proteína	Basal	CD40L 10ng/mL	CD40L 50ng/mL	CD40L 100ng/mL	Basal	CD40L 10ng/mL	CD40L 50ng/mL	CD40L 100ng/mL
CD40	18.5±6.9	17.3±7.1	15.8±7.2	20.3±6.9	15.7±7.3	22±9.65	18.5±7.3	15.8±4.6
	Basal	LIGHT 10ng/mL	LIGHT 50ng/mL	LIGHT 100ng/mL	Basal	LIGHT 10ng/mL	LIGHT 50ng/mL	LIGHT 100ng/mL
LTβR	32.2±8.6	37.1±10.4	32.5±8.6	30±10.2	43.2±10.5	44.2±10.5	44.1±10	45.9±9.7
HVEM	8.9±4.6	9.6±5.6	6.4±2.8	5.9±2.9	7.2±4.3	8.5±3.6	9.5±4.5	9.6±3.4

Tabela 6: Efeito das citocinas CD40L (10,50 e 100ng/mL) e LIGHT (10,50 e 100ng/mL) na expressão de (A) CD40, (B) LTβR, (C) HVEM na superfície de neutrófilos de indivíduos saudáveis. As células foram pré-incubadas com CD40L ou LIGHT por 30 min. n=10 ou 2 horas n=4, 37°C, 5%CO₂. Posteriormente, as células foram incubadas por 30 minutos à 4°C com os anticorpos específicos. A porcentagem de células positivas foi determinada pelos anticorpos (anti-CD40, anti-LTβR e anti-HVEM) em 10.000 eventos adquiridos, como descrito. Resultados foram apresentados como média ± SEM; P>0.05 para todos os tratamentos; determinado por ANOVA(*repeated measures*), seguido por *Dunnnett's Multiple Comparisons*.

Proteína	Basal		CD40L 10ng/mL		CD40L 50ng/mL		CD40L 100ng/mL	
	%Cels. Positivas	MFI	%Cels. Positivas	MFI	%Cels. Positivas	MFI	%Cels. Positivas	MFI
CD41a	97.5±0.6	13380±994	97.8±0.4	14452±1328	96.8±0.5	14872±825.8	97.6±0.6	14500±761.7
$\alpha_{IIb}\beta_3$ ativada	3.7±0.6	5688±376	4.2±1.04	5474±575	2.9±0.7	7502±1159	2.1±0.5	8804±1970
CD62P	9.7±1.2	2091±166	11.6±1.7	1885±554	12.4±2.1	1904±480	13.3±2.6	1482±214
CD49b	66.4±5.9	1311±99.6	66.6±6.2	1447±192	65.7±6.0	1212±54.8	65.5±5.7	1213±36.2

Tabela 7 - Efeito da citocina CD40L (10,50 e 100ng/mL) na expressão de CD41a (subunidade α_{IIb} da integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$), $\alpha_{IIb}\beta_3$ na sua conformação de alta afinidade, CD62P (P-selectina) e CD49b (subunidade $\alpha_2\beta_1$), na superfície plaquetas. As plaquetas foram pré-incubadas com CD40L por 30 min. em T.A. Posteriormente, foram incubadas por 20 minutos à T.A com os anticorpos específicos. Os resultados da expressão das moléculas de adesão estão representados na média $\pm$ SEM de porcentagem de plaquetas ligadas ao anticorpo (% positiva) e na Intensidade Média de Fluorescência (MFI) de anticorpo ligado para cada plaqueta, n=6. Determinado por ANOVA (*repeated measures*) seguido por *Dunnett's Multiple Comparisons*.

Proteína	Basal		LIGHT 10ng/mL		LIGHT 50ng/mL		LIGHT 100ng/mL	
	%Cels. Positivas	MFI	%Cels. Positivas	MFI	%Cels. Positivas	MFI	%Cels. Positivas	MFI
CD41a	97.57±0.6	13485±1015	97.32±0.6	13316±819	97.57±0.8	13980±561	96.67±1.4	14335±660.3
$\alpha_{IIb}\beta_3$ ativada	3.73±0.6	6250±789	3.80±1.5	8216±1644	4.06±1.4	9068±2002	4.08±1.4	7846±2053
CD62P	9.56±1	2124±137	8.76±1.3	1902±158	8.66±0.9	1836±272	9.55±2.1	1924±289
CD49b	69.05±6.7	1317±99.06	69.05±6.6	1249±62.02	68.77±7.3	1218±72.96	68.10±7.3	1297±80.4

Tabela 8 - Efeito da citocina LIGHT (10,50 e 100ng/mL) na expressão de CD41a (subunidade α_{IIb} da integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$), $\alpha_{IIb}\beta_3$ na sua conformação de alta afinidade, CD62P (P-selectina) e CD49b (subunidade $\alpha_2\beta_1$), na superfície plaquetas. As plaquetas foram pré-incubadas com CD40L por 30 min. em T.A. Posteriormente, foram incubadas por 20 minutos à T.A com os anticorpos específicos. Os resultados da expressão das moléculas de adesão estão representados na média $\pm$ SEM de porcentagem de plaquetas ligadas ao anticorpo (% positiva) e na Intensidade Média de Fluorescência (MFI) de anticopo ligado para cada plaqueta, n=6. Determinado por ANOVA (*repeated measures*) seguido por *Dunnett's Multiple Comparisons*.

7. Discussão

Nosso grupo demonstrou que as citocinas inflamatórias CD40L e LIGHT estão presentes em altas concentrações no plasma de indivíduos com anemia falciforme (Garrido et al., 2012). Sabe-se, que estas citocinas estão relacionadas com estresse oxidativo, inflamação, doenças vasculares, etc. Sendo assim, fez-se necessário um melhor entendimento do efeito destas citocinas nas propriedades adesivas de neutrófilos, hemácias e plaquetas.

Estudos relacionados em nosso laboratório (Garrido et al., 2012), revelaram que LIGHT é encontrada em níveis elevados em pacientes com anemia falciforme e sua correlação com CD40L indica que as produções destas duas proteínas podem estar relacionadas. Nossos dados mostram que as citocinas CD40L e o LIGHT tem a capacidade de aumentar as propriedades adesivas de neutrófilos; após um estímulo de 30 minutos com estas citocinas, os neutrófilos demonstraram uma capacidade de adesão maior para a fibronectina, uma proteína da matriz extracelular e ao ICAM-1, molécula de adesão celular expressa em células endoteliais. Essas alterações nas propriedades adesivas podem ser intermediada pelas integrinas; pela mobilização dessas moléculas de adesão para a superfície celular (SIMS, 2002), pela mudança de afinidade (SHIMAOKA *et al.*, 2002) ou por alterações na avidéz das integrinas (HOGG *et al.*, 2001; LEE e BANKSTON, 1995; HEIT *et al.*, 2005).

Os estímulos com CD40L e LIGHT não foram capazes de alterar as expressões das integrinas (CD11b/CD18) Mac-1 e (CD11a/CD18) LFA-1 na superfície dos neutrófilos, como pode ser visto após tratamento dos neutrófilos com a citocina inflamatória TNF- α . Estudos demonstraram que as integrinas podem mudar a sua conformação após certos estímulos e consequentemente aumentar a sua afinidade de ligação (ASTROF *et al.*, 2006; LEY *et al.*, 2007). Por outro lado, os anticorpos bloqueadores das funções das integrinas Mac-1 e LFA-1 provocaram uma diminuição significativa na adesão de neutrófilos para os ligantes fibronectina e ICAM-1, após estímulo com o CD40L ou LIGHT. Estes resultados indicam que as alterações nas propriedades adesivas dos neutrófilos após estímulo com CD40L ou LIGHT parecem ser intermediado por uma mudança na conformação e afinidade destas integrinas e não por uma alteração na expressão destas proteínas na superfície destas células.

Adicionalmente, os estímulos com CD40L e LIGHT provocaram uma diminuição significativa na expressão proteica de L-selectina; sabe-se que os neutrófilos liberam a L-selectina intermediada por um mecanismo de “*shedding*” (VEGA *et al.*, 2009; BALL, *et al.*, 2011; SELLER, *et al.*, 2011), o que nos indica novamente que estas citocinas tem capacidade aparentemente de ativar os neutrófilos.

O CD40L e o LIGHT tem a capacidade de aumentar a adesão das hemácias; após um estímulo de 30 minutos com estas citocinas, as hemácias demonstraram uma capacidade de adesão maior para a fibronectina. No entanto, ainda não foi realizado um estudo da expressão e ativação das moléculas de adesão para poder identificar o mecanismo pelo qual acontece este aumento de adesão.

Nas plaquetas, o CD40L e o LIGHT não alteraram as propriedades adesivas; após um estímulo de 30 minutos. A expressão das principais moléculas de adesão das plaquetas de indivíduos saudáveis foi determinada por citometria de fluxo na superfície. Foi avaliado a expressão da integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$ através do anticorpo CD41a, que reconhece a subunidade α_{IIb} , não apresentou diferenças significativas nas plaquetas estimuladas com CD40L e LIGHT. A ligação do anticorpo PAC-1 que reconhece a integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$ na sua conformação de alta afinidade, também não apresentou diferenças significativas entre as plaquetas estimuladas com CD40L e LIGHT. A expressão da P-selectina, avaliada pelo anticorpo CD62P, não apresentou diferenças significativas em comparação com as plaquetas estimuladas pelo CD40L e LIGHT.

Atualmente, sabe-se que o CD40L é expresso por uma variedade de células, incluindo monócitos, macrófagos, células dendríticas, basófilos, eosinófilos, células B e plaquetas. A expressão proteica de CD40L em neutrófilos, hemácias e plaquetas, foi de aproximadamente (1,2%), (0,04%) e (0,7%), respectivamente, constituindo uma expressão muito baixa. O receptor CD40 apresentou uma expressão proteica de (6,6%), (1,0%) e (37,2%) em neutrófilos, hemácias e plaquetas, respectivamente. Sabe-se que o receptor CD40 é expresso na superfície de monócitos, macrófagos, células endoteliais e plaquetas (INWALD *et al.*, 2003; GAWAJ *et al.*, 2005).

Já a expressão de proteína de LIGHT em neutrófilos, hemácias e plaquetas, foi de aproximadamente (65%) , (<1%) e (40%), respectivamente. Em nossos estudos a expressão do receptor HVEM na superfície de neutrófilos, hemácias e plaquetas foi de aproximadamente (10%) , (1%) e (7%), respectivamente. Sabe-se que o HVEM é expresso em uma variedade de células, incluindo, as células T, células B, células NK, monócitos e neutrófilos (HEO *et al.*, 2007). Nossos resultados também demonstram a expressão de LT β R em neutrófilos, hemácias e plaquetas foi aproximadamente (20%) , (<0.1%) e (6%), respectivamente. Segundo (OWENS, *et al.*, 2010), o LT β R está associado com a aterosclerose e suas complicações. Portanto, dado a baixa expressão dos receptores conhecidos de LIGHT e CD40L na superfície das hemácias, o mecanismo pelo qual estas citocinas induzem a adesão destas células não é claro. A expressão destes receptores na superfície dos neutrófilos foi maior e podemos sugerir que as citocinas LIGHT e CD40L estimulam os neutrófilos através da sua ligação com estes receptores. As avaliações das expressões proteicas dos receptores CD40, LT β R e HVEM em neutrófilos não apresentaram diferenças significativas quando estimulados com TNF- α e IL-8. Adicionalmente, as expressões proteicas de CD40, LT β R e HVEM, quando tratados com CD40L e LIGHT (pré-tratamento de 30 minutos e 2 horas) não apresentaram diferenças significativas. Dados indicam que estímulos inflamatórios não induzem uma expressão maior de receptores de LIGHT e CD40L na superfície destas células.

O presente estudo demonstrou que as citocinas CD40L e LIGHT tem a capacidade de ativar e aumentar propriedades adesivas dos neutrófilos e hemácias. Nos neutrófilos, este aumento aparentemente foi intermediado por uma ativação da conformação (ou afinidade) das integrinas na superfície dos neutrófilos. Como estas duas citocinas são altamente expressas em doenças inflamatórias, resultados indicam que o efeito destas moléculas na ativação de células inflamatórias como os neutrófilos podem ter um efeito importante em doenças como a aterosclerose e a anemia falciforme. O conhecimento dos efeitos do CD40L e LIGHT, nos demonstra o papel destas duas citocinas como mediadores do processo inflamatório.

8. Conclusão

Estes resultados indicam que as citocinas inflamatórias CD40L e LIGHT aumentaram as propriedades adesivas de neutrófilos e hemácias, mas não das plaquetas. Esse aumento da adesão nos neutrófilos não está associado ao aumento das expressões das integrinas (CD11b/CD18) Mac-1 e (CD11a/CD18), LFA-1. O motivo do aumento na adesão de hemácias ainda é desconhecido e maiores estudos devem ser realizados, avaliando a expressão e ativação das moléculas de adesão das hemácias. Nas plaquetas, não houve nenhuma alteração na expressão das moléculas de adesão, consequentemente, nenhuma alteração na adesão.

Logo, tendo em vista que estas citocinas inflamatórias estão envolvidas nos processos de estresse oxidativo, inflamação e doenças vasculares, acredita-se que possam contribuir de forma significativa em doenças inflamatórias, como a aterosclerose e anemia falciforme.

9.Referências Bibliográficas

- ABBAS, A. K., LICHTMAN, A. H. *Imunologia Celular e Molecular*, 5º ed. Rio de Janeiro: **Elsevier**, 2005
- AFFORD, S.C.; RANDHAWA, S.; ELIOPOULOS, A.G.; HUBSCHER, S.G.; YONG, L.S.; ADAMS, D.H. CD40 activation induces apoptosis in cultured human hepatocytes via induction of cell surface fas ligand expression and amplifies fas-mediated hepatocyte death during allograft rejection. **J Exp Med** 189: 441-46, 1999.
- ANTONIADES, C.; BAKOGIANNIS, C.; TOUSOULIS, D.; ANOTOPOULOS, A.; STEFANIDIS, C. The CD40/CD40 ligand system. **J. American Col of Cardiology**.54:669-77, 2009
- ASSIS, A.; CONRAN, N.; CANALLI, A.A.; LORAND-METZE, I.; SAAD, S.T.O.; COSTA, F.F. Effect o cytokines on sickle neutrophil adhesion to fibronectin. **Acta Haematol.** 481, 2004.
- ASTROF, N. S., SALAS, A., SHIMAOKA, M., CHEN, J. & SPRINGER, T. A. Importance of force linkage in mechanochemistry of adhesion receptors. **Biochemistry** 45, 15020–15028, 2006.
- BRADLEY, P.P; PRIEBATD, DA.; CHRISTENSEN, R D.; ROTHSTEIN, G. Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with na enzyme marker. **J Invest Dermatol.** 1982:78 (3): 206-9.
- CARLOS, TM.; HARLAN, J.M. Leukocyte-endothelial adhesion molecules. **Blood** 1994;84 (7): 2068-101.
- CHAKRABARTI, S. CD40 ligand influences platelet release of reactive oxygen intermediates. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.** 25:2428-2434, 2005.
- CHANG, Y.H.; HSIEH, S.L.; CHEN, M.C.; LIN, W.W. Lymphotoxin beta receptor induces interleukin 8 gene expression via NF-kappaB and AP-1 activation. **Exp Cell Res** 278:166–174. 2002.

- CLARK, I. A. How TNF was recognized as a key mechanism of disease. **Cytokine Growth Factor Rev.** 18, 335–343, 2007.
- CONRAN, N.; COSTA F.F. Hemoglobin disorders and endothelial cell interactions **Clinical Biochemistry** 42: 1824–1838, 2009.
- COTRAN, R.S., KUMAR, V., COLLINS, T. Robbins. “Patologia Estrutural e Funcional”; tradução João Lobato do Santos e Wilhermo Torres. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000.
- DE CLERCK, L.S, DE GENDT, C.M, BRIDTS, CH, VAN OSSELAER, N, STEVENS, WJ. Expression of neutrophil activation markers and neutrophil adhesion to chondrocytes in rheumatoid arthritis patients: relationship with disease activity. **Research in Immunology.** 1995; 146: 81-7.
- DE FRANCESCHI, L.; CORROCHE, R. Established and experimental treatments for sickle cell disease. **Haematologica**, 89: 348-56, 2004.
- ESHGHI, S., VOGELZANG, M.G., HYNES, O. R., GRIFFITH, L.G., LODISH, H.F. “ $\alpha_4\beta_1$ integrin and erythropoietin mediate temporally distinct steps in erythropoiesis: integrins in red cell development”. **Journal of Cell Biology.** 17: 881-880, 2004.
- ETZIONI, A. Integrins: The Molecular Glue of Life. **Hospital Practice**, 2001.
- FRETTE P.S.; Sickle cell vasoocclusion: heterotypic, multicellular aggregations driven by leucocyte adhesion. **Microcirculation** 11: 167-77, 2004.
- FRETTE, P.S. Sickle cell vaso-occlusion: multistep and multicellular paradigm. **Current Opinion in Hematol**, 9: 101-6, 2002.
- FRETTE, P.S., JOHNSON, R.C., HYNES, R.O., and WAGNER, D.D. “Platelet rolling on stimulated endothelium in vivo: an interaction mediated by endothelial P-selectin”. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.** 92: 7450-54, 1995.

- FRENETTE, P.S., MOYNA, C., HARTWELL, D.W., LOWE, J.B., HYNES, R.O., WAGNER, D.D. “Platelet-endothelial interactions in inflamed mesenteric venules”. **Blood** 91: 1318-24, 1998.
- GALKINA, E.; LEY, K. Vascular adhesion molecules in Atherosclerosis. **Arterioscler Thromb Vasc Biol** 27:2292–2301. 2007.
- GAMBERO, S.; CANALLI, A.A.; TRAINA F.; ALBUQUERQUE, D.M.; SAAD, S.T.O.; COSTA, F.F.; Therapy with hydroxyurea reduces adhesion molecule gene and protein expression in sickle red cells with a concomitant reduction in adhesive properties, **Eur J Haematol**, 78, 144-151., 2007.
- GARRIDO, V.; T. ; PROENÇA-FERREIRA, RENATA ; DOMINICAL, VENINA M. ; TRAINA, FABIOLA ; BEZERRA, Marcos A. C. ; MELLO, MARIANA R. B. ; COLELLA, MARINA P. ; ARAÚJO, ADERSON S. ; SAAD, SARA T. O. ; COSTA, FERNANDO F. ; CONRAN, N. . Elevated plasma levels and platelet-associated expression of the pro-thrombotic and pro-inflammatory protein, TNFSF14 (LIGHT), in sickle cell disease. **British Journal of Haematology** (Print), v. 158, p. 788-797, 2012.
- GAWAZ, M., LANGER, H., MAY, A.E. “Platelets in inflammation and atherogenesis”. **J. Clin. Invest.** 115: 3378-84, 2005.
- GOLIAS, C.; TSOUTSI, E.; MATZIRIDIS, A.; MAKRIDIS, P.; BATISTATOU, A.; CHARALABOPOULOS, K. Review. Leukocyte and endothelial cell adhesion molecules in inflammation focusing on inflammatory heart disease. **In Vivo**. 21:757-69, 2007.
- GRANGER, S & RICKERT, S. LIGHT-HVEM signaling and the regulation of T cell-mediated immunity. **Cytokine & Growth Fac. Rev.** 14:289-296, 2003.

- GREENWALT, D.E.; LIPSKY, R.H.; OCKENSHOUSE, C.F.; IKEDA, H.; TANDON, N N.; JAMIESON, G A. Membrane glycoprotein CD36: a review of its roles in adherence, signal transduction, and transfusion medicine. **Blood**. 1992;80(5): 1105-15.
- HEBBEL, R.P. Blockade of adhesion of sickle cells to endothelium by monoclonal antibodies. **N.Engl.J.Med**. 342:1910–1912, 2000
- HEIT, B.; COLARUSSO, P.; KUBES. Fundamentally different roles for LFA-1, Mac-1 and alpha4-integrin in neutrophil chemotaxis. **J Cell Sci**,118(Pt 22): 5205-20, 2005.
- HENSON, P.M.; JOHNSTON, R.B. Tissue injury in inflammation: oxidants, proteases and cationic proteins. **J Clin Invest** (79): 669-674, 1987.
- HEO, K, S.; YOON, A.M.; LEE, C.S.; JU, A.S.; CHOI, H.J.; SUH, G.P.; KWON, B. S.; KIM, S.B. HVEM signaling in monocytes is mediated by intracellular calcium mobilization. **J of Immunology**.179:6305-6310,2007.
- HOGG, N.; LEITINGER, B. Shape and shift changes related to the function of leukocyte integrins LFA-1 and Mac-1. **J Leukoc Biol**, 69(6): 893-8, 2001.
- INWALD DP, McDOWALL A, PETERS MJ, CALLARD RE, KLEIN NJ. CD40 is constitutively expressed on platelets and provides a novel mechanism for platelet activation. **Circ Res** 2003;92:1041–8.
- JOHNSON, C & TELEN, MJ. Adhesion molecules and hydroxyurea in the pathophysiology of sickle cell disease. **Haematologica**. 93:481-485, 2008.
- KAHN, M.L. “Platelet-collagen responses: molecular basis and therapeutic promise”. **Semin. Thromb. Hemost**. 30: 419-25, 2004.

- KANSAS, G.S. "Selectin and their ligands: current concepts and controversies". **Blood** 88: 3259-87, 1996.
- KASIRER-FRIEDE, A., WARE, J., LENG, L., MARCHESE, P., RUGGERI, Z.M., SHATTIL, S.J. "Lateral clustering of platelet GPIb-IX complexes leads to up-regulation of the adhesion function of integrin alpha Iib beta 3". **J Biol Chem** 277: 11949-56, 2002.
- KARMANN, K.; HUGHES, C.C.; SCHEEECHERNER, J.; FANSLOW, W.C.; POBER, J.S. CD40 on human endothelial cells: inducibility by cytokines and functional regulation of adhesion molecule expression. **Proc Natl Acad Sci** 92: 4342-6, 1995.
- KAUL, D.K; FABRY, M.E. In vivo studies of sickle red blood cells. **Microcirculation**. 11:153–165; 2004.
- KAUL, D.K; FINNEGAN, E.; BARABINO, G.A. Sickle Red Cell – Endothelium Interactions. **Microcirculation**. 16:97-111; 2009
- KHAGHAN, V.A., THIAGARAJAN, P. "Leukocyte adhesion thrombosis". **Curr Opin Hematol** 13: 34-39, 2006.
- KIERZENBAUM, A.L em. "Histologia e Biologia Celular: Uma Introdução à Patologia". **Elsevier**, pp. 11,13. Rio de Janeiro, 2004,
- KINLAY, S.; BEHRENDT, D.; WAISTEIN, M.; BELTRAME, J.; FANG, C. J.; CREAGER, A.M.; SELWYN, .P.A.; GANZ, P. Role of endothelin-1 in the active constriction of human atherosclerotic coronary arteries.**Circulation**.104:1114-1118, 2001.
- KULKARNI, S.; DOPHEIDE, S.M.; YAP, C.L.; RAVANAT, C.; FREUND, M.; MANDIN, P.; HEEL, K.A.; STREET, A.; HARPER, I.S.; LANZA, F.; JACKSON, S.P. "A revised model of platelet aggregation" **J Clin Invest** 105:783-91, 2000.

- LANARO, C.; FRANCO-PENTEADO C. F.; ALBUQUEQUE D. M.; SAAD S. T. O.; CONRAN N.; COSTA F. F. 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** Volume 85, February 2009.
- LEE, W.H.; KIM, S.H.; LEE, Y.; LEE B.B.; KWON, B.; SONG, H.; KWON, B.S., PARK, J.E. Tumor necrosis factor receptor superfamily 14 is involved in atherogenesis by inducing proinflammatory cytokines and matrix metalloproteinases. **Arterioscler Thromb Vasc Biol** 21:2004–2010. 2001.
- LEE, J O.; BANKSTON, L.A.; ARNAOUT, M.A.; LIDDINGTON, R.C Two conformations of the integrin A-domain (I-domain): a pathway for activation? **Structure**, 3(12): 1333-40, 1995.
- LEVI, M. “Platelets”. **Crit Care Méd** 33(12): S523-25, 2005.
- LOURENÇO, D.M. “Tombocitopenia em Hematologia: fundamentos e práticas”. Eds. Zago, M.A., Falcão, R.P., Pasquini, R. **Ed.Atheneu**, pp.70. São Paulo, 2001,
- LORENOWICZ, M.J.; FERNANDEZ-BORJA, M.; HORDIJK, PL. cAMP signaling in leukocyte transendothelial migration. **Arter. Thromb. Vasc. Biol.** 27:1014-22, 2007.
- LUM, A.F.; WUN, T.; STAUNTON, D.; SIMON, S.I. Inflammatory potential of neutrophils detected in sickle cell disease. **Am J Hematol**, 76:126-33, 2004.
- LUSIS, A.J.; MAR, R.; PAJUKANTA, P. Genetics of atherosclerosis. **Annu Rev Genomics Hum Genet** 5:189-218, 2004.
- LUSTER AD. Chemokines – Chemotactic cytokines that mediate inflammation. **The New England Journal of Medicine**. 1998; 338 (7): 436-45.
- MOREL, Y.; SCHIANO DE COLELLA, J.M.; HARROP, J. DEEN, K.C.; HOLMES, S.D.; WATTAM, T.A. **J. Immunology**. 165:4397-404, 2000.

- MOREL, Y.; SCHIANO De COLELLA, J.M.; HARROP, J.; DEEN, K.C.; HOLMES, S.D.; WATTAM, T.A.; KHANDEKAR, S.S.; TRUNEH, A.; SWEET, R.W.; GASTAUT, J.A.; OLIVE, D.; COSTELLO, R.T. 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** 165:4397–4386. 2000.
- MUKAIDA, N. Interleukin-8: an expanding universe beyond neutrophil chemotaxis and activation. **Int. J. Hematol.** 72, 391–398, 2000.
- NIESWANDT, B., and WATSON, S.P. “Platelet-collagen interaction: is GPVI the central receptor?” **Blood** 102: 449-61, 2003.
- OKPALA, I. Leukocyte adhesion and the pathophysiology of sickle cell disease. **Current Opinion in Hematology.** 13: 40-44, 2006.
- OKUMURA, N.; TSUJI, K.; NAKAHATA, T. Changes in cell surface antigen expressions during proliferation and differentiation of human erythroid progenitors. **Blood.** 1992;80(3): 642-50.
- OWENS, M A.; LOKEN, M R. Flow citometry principles for clinical laboratory practice. New York – EUA. Ed. Wiley Liss. 224p, 1995.
- OWENS, W.A.; MATULEVICIUS, S.; ROHATGI, A.; AYERS, R.C.; DAS, R.S.; KHERA, A.; McGUIRE, K.D.; LEMOS, A. J. Circulating lymphotoxin B receptor and atherosclerosis: Observations from the Dallas Heart Study. **Atherosclerosis.** 212:601-606,2010.
- PATHARE, A.; KINDI, S.A.; DAAR, S.; DENNISON, D. Cytokines in sickle cell disease. **Haematology.** 8:329-37, 2003.

- PROENÇA-FERREIRA, R., FRANCO-PENTEADO, C. F., TRAINA, F., SAAD, S.T.O COSTA, F. F., 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”. **British Journal of Haematology** 149: 280-288, 2010.
- RIDKER, P.M.; HENNEKENS, C.H.; BURING, J.E.; RIFAI, N. C-reactive protein and other markers of inflammation in the prediction of cardiovascular disease in women. **N Engl J Med** 342(12):836–43, 2000.
- RIZVI, M.; PATHAK, D.; FREEDMAN, J.; CHAKRABARTI, S. CD40-CD40 ligand interactions in oxidative stress, inflammation and vascular disease. **Trends in Mol Med.** 14: 530-538, 2008.
- ROSEN SD, BERTOZZI CR. The selectins and their ligands. **Current Opinion in Cell Biology.** 1994; 6(5): 663-73.
- ROSS, R. Atherosclerosis--an inflammatory disease. **N Engl J Med** 340:115-26, 1999.
- RUGGERI, Z.M. “Plateletes in atherothrombosis”. **Nat Med** 8:1227-34, 2002.
- SANDBERG, W.J.; HALVORSEN, B.; YNDESTAD, A.; SMITH, C.; OTTERDAL, K.; BROSSTAD, F.R.; FROLAND, S.; OLOFSSON, P.S.; DAMAS, J.; GULLESTAD, L.; HANSSON, G.; OIE, E.; AUKRUST, P. Inflammatory interactions between LIGHT and proteinase-activated receptor-2 in endothelial cells. **Circ.Research.**104:60-68, 2009.
- SCHEIERMANN, C.; KUNISAKI, Y.; JANG, J.E.; FRENETTE, P.S. Neutrophil microdomains: linking heterocellular interactions with vascular injury. **Curr. Opin. Haemtol.** 17:25-30, 2010.

- SCHOENBECK, U.; LIBBY, P. CD40 Signaling and Plaque Instability. **Circ Res.** 89: 1092-103, 2001.
- SHOLZ, H.; SANDBERG, W.; DAMAS, J.K.; ANDREASSEN, A.K.; GULLESTAD, L.; FROLAND, S.S.; YNDESTAD, A.; AUKRUST, P.; HALVORSEN, B. Enhanced plasma levels of LIGHT in unstable angina: possible pathogenic role in foam cell formation and thrombosis. **Circulation.** 112:2121-2129, 2005.
- SHIMAOKA, M.; TAKAGI, J.; SPRINGER, T.A. Conformational regulation of integrin structure and function. **Annu Rev Biophys Biomol Struct**, 31:485-516, 2002.
- SIMS, T N; DUSTIN, M.L.. The immunological synapse: integrins take the stage. **Immunol Ver**, 186: 100-17, 2002.
- SPRAGUE, A.H.; KALIL, R.A. Inflammatory cytokines in vascular dysfunction and vascular disease. **Bio Pharmacology.** 78: 539-552, 2009.
- STEINBERG, M.H. Management of sickle cell disease. **N Engl J Med**, 340: 1021-30, 1999.
- STEINBERG, M.H. Pathophysiologically based drug treatment of sickle cell disease. **TRENDS in Pharmacological Sciences** (27): 4, 2006.
- STUART, M.J.; NAGEL, R.L. Sickle-cell disease. **Lancet** 364: 1343-1360, 2004.
- SUNDD, P.; POSPIESZALSKA, MK.; CHEUNG, L.S.; KONSTANTOPOULOS, K.; LEY, K. Biomechanics of leukocyte rolling. **Biorheology.** 48:1-35, 2011.
- STYLES, L.A.; LUBIN, B.; VICHINSKY, E.; LAWRENCE, S.; HUA, M.; TEST, S.; KUYPERS, F. Decrease of very late activation antigen-4 and CD 36 on reticulocytes in sickle cell patients treated with hydroxyurea. **Blood.** 98(7): 2554-59, 1997.

- SZMITKO, P.E.; WANG, C.H.; WEISEL, R.D.; DE ALMEIDA, J.R.; ANDERSON, T.J.; VERMA, S. New markers of inflammation and endothelial cell activation: Part I. **Circulation**. 108(16):1917–23, 2003.
- SWERLICK, R.A.; ECKMAN, J.R.; KUMAR, A.; JEITLER, M. WICK, T.M. $\alpha 4\beta 1$ - integrin expression os sickle reticulocytes: Vascular cell adhesion molecule-1 dependent binding to endothelium. **Blood** 82: 189, 1993.
- TARRANT, T.K.; PATEL D, D. Chemokines and leukocyte trafficking in rheumatoid arthritis. **Pathophysiology**. 2006; 13: 1-14.
- TAYLOR, P.C.; PETERS, M.A.; PALEOLOG, E.; CHAPMAN, P.T.; ELLIOTT MJ, McCLOSKEY R, *et al*. Reduction of chemokine levels and leukocyte traffic to joints by tumor necrosis factor alpha blockade in patients with rheumatoid arthritis. **Arthritis & Rheumatism**. 43 (1): 38-47,2000.
- TOETSCH, S.; OLWELL, P.; PRINA-MELLO, A.; VOLKOV, Y. The evolution of chemotaxis assays from static models to physiologically relevant platforms. **Integrative Biology**. 2009; 1: 170-81.
- TURHAN, A.; WEISS, L.A.; MOHANDAS, N.; COLLIER, B.S.; FRENETTE,P.S. Primary role for adherent leukocytes in sickle cell vascular occlusion: A new paradigm. **PNAS**, 99 (5): 3047-3051, 2002.
- URBICH, C.; DERNBACH, E.; AICHER, A.; ZEIHNER, A.M.; DIMMERLER, S. CD40 ligand inhibits endothelial cell migration by increasing production of endothelial reactive oxygen species. **Circulation**. 106: 981–986, 2002.
- VANICHAKARN, P. Neutrophil CD40 enhances platelet-mediated inflammation. **Thromb. Res**. 122:346-358, 2008.
- VARGA-SZABO, D.; PLEINES, I.; NIESWANDT, B. **Arterioscle. Thromb. Vasc. Biol**. 28:403-412, 2008.

- VERRI Jr W.A.; SOUTO, F.O.; VIEIRA, S.M.; ALMEIDA, S.C.L.; FUKADA, S.Y.; XU, D *et al.* IL-33 induces neutrophil migration in rheumatoid arthritis and is a target of anti-TNF therapy. **Annals of the Rheumatic Diseases**. 2010; 1-7.
- VESTWEBER, D. Ligand specificity of selectins. **Journal of Cellular Biochemistry**. 1996; 61 (4): 585-91.
- WEI, C.Y.; C, H.Y.; HO, M.F.; HSIEH,L.S.; LIN, W.W. Signaling pathways of LIGHT induced macrophage migration and vascular smooth muscle cell proliferation. **J of Cell Physiology**. 209:735-743, 2006.
- WEISS, S.J. Tissue destruction by neutrophils. **New Engl J Med** 320:356-376, 1989.
- YUSUF-MAKAGIANSAR, H.; ANDERSON, M.E., YAKOVLERA, T.V.; MURRAY, J.S.; SIAHAAN, T.J. Inhibition of LFA-1/ICAM-1 and VLA-4/VCAM-1 as a therapeutic approach to inflammation and autoimmune diseases. **Medicinal Research Reviews**. 2002; 22 (2): 146-67.
- ZAGO, M.A.; FALCÃO, R.P.; PASQUINI, R. Granulócitos. **Hematologia: Fundamentos e Prática**, Ed.Atheneu, São Paulo, pp.33-40, 2004.
- ZARBOCK, A.; LEY, K. Mechanisms and consequences of neutrophil interaction with the endothelium. **The American journal of Pathology**. 2008; 172(1): 1-7.
- ZOU, G.M.; HU, W.Y. LIGHT regulates CD86 expression on dendritic cells through NF-kB, but not JNK/AP-1 signal transduction pathway. **J Cell Physiol** 205:437-443. 2005.

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)

(Controle)

Título da Pesquisa: Avaliação dos efeitos das proteínas inflamatórias CD40L e LIGHT nas propriedades adesivas dos neutrófilos e outros tipos celulares.

Pesquisadores: Pedro Paulo Dias Junior e Dra. Nicola Amanda Conran Zorzetto **Local:** HEMOCENTRO/FCM – UNICAMP.

Objetivo da pesquisa: Entender melhor o papel das proteínas inflamatórias CD40L e LIGHT nas propriedades adesivas dos neutrófilos e outros tipos celulares em indivíduos com e sem doenças inflamatórias. Esta pesquisa será importante para podermos entender melhor a relação entre as células brancas, células vermelhas e plaquetas quando estimuladas com as proteínas inflamatórias CD40L e LIGHT. Esse conhecimento será importante para melhor entendermos a participação dessas proteínas em indivíduos com doenças inflamatórias.

Como você não tem uma doença inflamatória (como a doença falciforme, aterosclerose, artrite reumatóide, etc.), estamos pedindo sua colaboração para a realização dessa pesquisa. Seus dados serão comparados com os dos pacientes com a Anemia Falciforme. Ninguém é obrigado a participar e se não aceitar não tem problema.

Se você concordar em participar, leia atentamente o que está escrito abaixo e assine duas vias desse termo de consentimento. Uma cópia será entregue a você.

Para participar da pesquisa será necessária sua autorização para que o pesquisador possa ver sua pasta médica para anotar e acompanhar seu tratamento (medicação e evolução da doença). Também será necessário uma coleta de 2 frascos de sangue (equivalente à 2 colheres de sopa ou 8 mL).

Os riscos dessa coleta são os mesmos de uma coleta para qualquer exame de sangue, que são: a dor da picada da agulha e algumas vezes um hematoma (ou mancha roxa) no local. Essa coleta será realizada numa veia do braço, por um profissional treinado do ambulatório do hemocentro da Unicamp. Mesmo depois de coletar o sangue, se decidir sair da pesquisa basta avisar ao pesquisador e todos os seus dados serão retirados da pesquisa.

As suas informações serão mantidas em sigilo pelo pesquisador e o material coletado será descartado (jogado fora) após a observação das células sanguíneas, no período máximo de 6 horas. Seus dados serão utilizados apenas para esta pesquisa e quando os resultados forem publicados não será revelado seu nome ou outras informações que possam identificar o paciente.

Você não terá nenhuma vantagem em participar dessa pesquisa e não haverá nenhum resultado de exame. Tudo será apenas para ajudar a medicina a conhecer melhor o efeitos dessas proteínas em indivíduos sem Anemia Falciforme.

Se tiver qualquer dúvida sobre sua participação no estudo você poderá procurar pelos pesquisadores **Pedro Paulo Dias Junior** (Fone: (19) 3521-8611) e **Nicola Conran Zorzetto** (Fone: (19) 3521 8734). Qualquer reclamação sobre a pesquisa pode ser feita ao **Comitê de Ética em Pesquisa da UNICAMP**, localizado na Rua Tessália Vieira de Camargo, 162 – FCM-UNICAMP, Fone: (19) 3521-8936.

Consentimento de Participação

Eu li/ouvi o conteúdo deste termo de consentimento e recebi orientações e esclarecimentos das minhas dúvidas. Entendi o objetivo da pesquisa, o que terei que fazer para participar, para que serão utilizadas as minhas informações, os riscos de participar. Com todas as informações, aceito participar dessa pesquisa.

Nome _____
Idade _____ anos, _____ Telefone _____
HC _____
Nome do responsável _____
Grau de parentesco _____

Outros pontos importantes foram enfatizados:

1. Ampla liberdade de recusar-me a participar do estudo ou retirar meu consentimento em qualquer fase deste, sem penalização ou prejuízo.
2. Garantia de esclarecimentos sobre o estudo, mesmo durante o seu decorrer.
3. Garantia de sigilo que assegure a minha privacidade quanto aos dados confidenciais envolvidos no estudo, quando da sua divulgação ou publicações científicas.
4. Quaisquer reclamações quanto ao andamento do projeto ou dos pesquisadores, posso contatar o CEP da FCM/UNICAMP.

Portanto, concordo em participar do estudo autorizando a equipe responsável à manipulação dos dados. Por estar de acordo com o conteúdo do termo de consentimento livre e esclarecido, dato e assino em duas vias, ficando uma em minha posse.

Voluntário (ou responsável)

Data

Pedro Paulo Dias Junior
(Pesquisador Responsável)

Data

Resumo apresentado na categoria oral no Congresso Brasileiro de Hematologia e Hemoterapia – Hemo 2011 (São Paulo, Brasil).

The pro-inflammatory and pro-thrombotic proteins, CD40L and LIGHT, augment the adhesive properties of neutrophils, *in vitro*.

P P Dias Junior¹ ; V T Garrido¹ ; V M Dominical¹ ; F F Costa¹ ; N Conran¹

¹ INCT do Sangue - Centro de Hematologia e Hemoterapia, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas, Campinas-SP.

Introduction: The adhesion of neutrophils to endothelial sites of inflammation constitutes a multi-step process that involves the interaction of neutrophil adhesion molecules, such as L-selectin (CD62L) and the β_2 integrins, Mac-1 and LFA-1 (CD11b/CD18 and CD11a/CD18) with ligands on the endothelium. In diseases associated with vascular inflammation, such as sickle cell disease (SCD) and atherosclerosis, alterations in the adhesion of leukocytes to the vascular wall play a central role in disease pathophysiology. CD40L and LIGHT are platelet-derived inflammatory cytokines belonging to the TNF family; both cytokines are potent activators of the endothelium and are suggested to play an important role in atherosclerosis. In addition, recent data suggest that both these molecules are highly elevated in the circulation of SCD individuals.

Aim: The objective of this study was to evaluate the effects of CD40L and LIGHT on the adhesive properties of neutrophils, as well as the expression of principal neutrophil adhesion molecules.

Material and Methods: Neutrophils were separated from the peripheral blood of healthy individuals over a Ficoll-Paque gradient and resuspended in RPMI medium. Cells (2×10^6 cells/ml) were co-incubated for 30 min with CD40L and LIGHT (10, 50 and 100ng/mL) before allowing cells to adhere to fibronectin (FN) ligand *in vitro* (30 min, 37°C, 5% CO₂). The effects of CD40L, LIGHT (10-100ng/mL) and TNF α (50 ng/ml) on the expressions of the CD62L, CD11b and CD11a molecules were determined by flow cytometry.

Results: The adhesion of neutrophils to FN was increased significantly increased following pre-incubation with CD40L for 30 min (Basal adhesion $11.5 \pm 1.2\%$, increased to $14.3 \pm 1.6\%$, 15.9 ± 2.3 and $13.8 \pm 1.7\%$, for 10, 50 and 100 ng/ml CD40L, respectively, $P < 0.05$ for all concentrations, $n \geq 8$). Incubation of neutrophils with LIGHT also augmented their adhesive properties (Basal adhesion; $11.5 \pm 1.2\%$, increased to $11.7 \pm 1.3\%$, $15.7 \pm 2.7\%$ and $16.4 \pm 2.2\%$ for 10, 50 and 100 ng/ml LIGHT, respectively, $n \geq 8$), although this increase was only significant at 100 ng/ml LIGHT ($P < 0.01$). The expressions of L-selectin, CD11b and CD11a were $87.7 \pm 3\%$, $99.8 \pm 0.1\%$, $99.5 \pm 0.2\%$ respectively, on neutrophils; however the expressions of these molecules (as indicated by mean fluorescence intensity for each cell) were not significantly increased following incubations of cells with either CD40L or LIGHT (10-100 ng/ml) for 30 min ($p > 0.05$, data not shown). In contrast, incubation of neutrophils with $\text{TNF}\alpha$ significantly increased CD11b expression on each cell from 4777.6 ± 660.2 to 7043.1 ± 586.4 MFI.

Conclusion: In conclusion, physiologically-relevant concentrations of the cytokines CD40L and LIGHT were able to significantly augment the adhesive properties of neutrophils, possibly indicating a novel role for these cytokines in vascular inflammation, as observed in SCD. Interestingly, the increase in neutrophil adhesion was not associated with increases in adhesion molecule expression, as is observed following activation of neutrophils with $\text{TNF}\alpha$. Further experiments will confirm whether these molecules induce neutrophil β_2 integrins to adopt their high affinity conformation, thus increasing their activity without increasing expression.