

## UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

## FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS

PÂMELA LARA DE BRITO

## INVESTIGAÇÃO IN VIVO DOS EFEITOS DA HEMÓLISE AGUDA E CRÔNICA NA FORMAÇÃO DE INFLAMASSOMAS

CAMPINAS 2024

## PÂMELA LARA DE BRITO

### INVESTIGAÇÃO IN VIVO DOS EFEITOS DA HEMÓLISE AGUDA E CRÔNICA NA FORMAÇÃO DE INFLAMASSOMAS

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Doutora em Ciências.

### ORIENTADORA: NICOLA AMANDA CONRAN ZORZETTO

ESTE TRABALHO CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA TESE DEFENDIDA PELA ALUNA PÂMELA LARA DE BRITO, E ORIENTADA PELA PROFA. DRA. NICOLA AMANDA CONRAN ZORZETTO.

> CAMPINAS 2024

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

Brito, Pâmela Lara de, 1992-

B777i Investigação in vivo dos efeitos da hemólise aguda e crônica na formação de inflamassomas / Pâmela Lara de Brito. – Campinas, SP : [s.n.], 2024.

Orientador: Nicola Amanda Conran Zorzetto. Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

 Hemólise intravascular. 2. Caspase 1. 3. Inflamassomos. 4. Células endoteliais. 5. Inflamação vascular. I. Zorzetto, Nicola Amanda Conran, 1972-.
 II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

#### Informações Complementares

Título em outro idioma: In vivo investigation of the effects of acute and chronic hemolysis on the formation of inflammasomes

Palavras-chave em inglês: Intravascular hemolysis Caspase 1 Inflammasomes Endothelial cells Vascular inflammation Área de concentração: Fisiopatologia Médica Titulação: Doutora em Ciências Banca examinadora: Nicola Conran Amanda Zorzetto Fabíola Traina Karina Tozatto Maio Sara Teresinha Olalla Saad Renata Sesti Costa Data de defesa: 09-04-2024 Programa de Pós-Graduação: Fisiopatologia Médica

Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)

- ORCID do autor: https://orcid.org/0000-0001-6319-4760 - Currículo Lattes do autor: http://lattes.cnpq.br/9738166271837826

## COMISSÃO EXAMINADORA DA DEFESA DE DOUTORADO

PÂMELA LARA DE BRITO

**ORIENTADORA: NICOLA AMANDA CONRAN ZORZETTO** 

**MEMBROS TITULARES:** 

1. PROF. DRA. NICOLA AMANDA CONRAN ZORZETTO

2. PROF. DRA. FABÍOLA TRAINA

3. PROF. DRA. KARINA TOZATTO MAIO

4. PROF. DRA. SARA TERESINHA OLALLA SAAD

5. PROF. DRA. RENATA SESTI COSTA

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

A ata de defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertação/Tese e na Secretaria do Programa da FCM.

Data de Defesa: 09/04/2024

## AGRADECIMENTOS

Ao Grande Arquiteto do Universo e coautor silencioso deste trabalho, que me deu a resiliência de uma árvore e a suavidade de suas folhas ao vento, e que me ensinou a encontrar a beleza na complexidade e simplicidade na verdade.

À minha brilhante orientadora e inspiradora, Dra Nicola Conran. Obrigada por ter me aceitado ainda uma pedra bruta e que com toda a sua benevolência e dedicação por anos, me ensinou o ofício da ciência e da pesquisa. Por acreditar nas minhas habilidades e me fazer superar os meus limites. Me sinto extremamente prestigiada por ter sido guiada por você e feliz por poder compartilhar as minhas conquistas.

À minha família que me incentivou a superar momentos difíceis e por compreenderem a minha ausência enquanto eu me dedicava à realização deste trabalho. À minha querida irmã Vanessa, que sempre me motivou com palavras de encorajamento e força, celebrando minhas vitórias como se fossem as suas. De forma incondicional ao Francisco, que me ensinou a transformar cada frustação em oportunidade, pela presença constante, incentivo e paciência me fazendo acreditar que posso mais do que imagino.

Aos meus amigos do Laboratório de Inflamação Vascular, Érica, companheira infalível de bancada, pela sua amizade, pelas maravilhosas discussões de hipóteses e antíteses, e por me acalentar nos meus momentos de lamúria. À Flávia Costa (nossa "Boquinha"), de coração grandioso, por se preocupar comigo, pelos momentos de distração e por todo suporte. Ao Lucas, pelo auxílio e compreensão nos momentos complicados, tanto com parte experimental quanto nas agendas de reuniões. Sem a ajuda de vocês a concretização plena deste trabalho não teria sido possível. Meus eternos agradecimentos.

Ao Prof. Fernando Ferreira Costa, e à equipe do laboratório de Genoma, por todo suporte e auxílio científico. À Carol Lanaro, por me introduzir ao minúsculo mundo do cultivo de células!

Á Prof. Dra. Aisling Dunne, e aos meus colegas da Trinity College Dublin, pelo aprendizado, amadurecimento e crescimento profissional.

À Irene e Nádia pela assistência com o citômetro de fluxo. Ao Márcio e Arnaldo pelo profissionalismo e cuidado diário com os animais do biotério.

E, finalmente, a todos que de alguma forma tocaram minha vida durante essa jornada, por me ensinarem a beleza da diversidade humana e a força que encontramos na conexão e no apoio mútuo.

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), processo nº 200797/2022-0.

E da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), processo nº 2019/18886-1.

"Na vida, não existe nada a se temer, apenas a ser compreendido."

Marie Curie

#### RESUMO

A hemólise intravascular, ou seja, a destruição das hemácias na circulação, está presente em diversas condições, como na anemia falciforme, pré-eclâmpsia e infecções. O rompimento das hemácias resulta na liberação de padrões moleculares associados ao dano (DAMPs), como hemoglobina (Hb) e heme, capazes de induzir o processo inflamatório estéril. Estudos indicam a participação do inflamassoma NLRP3 na resposta inflamatória ao heme e a outros DAMPs, no qual o inflamassoma processa a citocina IL-1β, contribuindo assim para a ativação e morte celular. O objetivo deste trabalho foi investigar os efeitos in vivo da hemólise intravascular aguda e crônica, e a participação da formação de inflamassomas e ativação de caspase-1 nestes mecanismos, visando aprimorar a compreensão da fisiopatologia de doenças em que ocorrem hemólise intravascular. No decorrer do estudo, utilizamos dois modelos murinos para simular a hemólise intravascular: um de caráter agudo, provocado por estresse osmótico (HEM), e outro de natureza crônica, desencadeado por repetidas baixas doses de fenilhidrazina (HEM Crônica). Em adição, ensaios in vitro foram realizados para avaliar a resposta de células endoteliais de cordão umbilical humano (HUVECs) aos estímulos de heme e da alarmina S100A8. Os dados coletados mostram que a indução de hemólise aguda eleva de forma imediata e significativa as concentrações de Hb e heme livres no plasma dos camundongos. A haptoglobina (Hp), uma proteína de remoção de hemoglobina, foi reduzida dentro das primeiras 3 horas, indicando seu rápido consumo, e a hemopexina (Hx), uma proteína de remoção de heme, teve tendência de redução após 3 horas. Os níveis plasmáticos tanto de Hp quanto Hx foram restaurados no período de 6 horas após a hemólise intravascular. Camundongos HEM apresentaram aumento significativo de leucócitos, especialmente granulócitos e monócitos, em 1 hora e 3 horas, associados a liberação das citocinas pró-inflamatórias TNF-α, IL-6, IL-1β e IL-18, além da S100A8. A hemólise intravascular aguda também induziu o aumento de monócitos (Ly6C<sup>hi</sup>CD43<sup>+</sup>) e neutrófilos (Ly6G<sup>hi</sup>CD11<sup>+</sup>) periféricos com caspase-1 ativada (FLICA<sup>+</sup>). Análise de microscopia intravital na microvasculatura do cremaster mostrou aumento de leucócitos em rolamento, aderidos e extravasados após estímulo de hemólise intravascular aguda, associado à diminuição significativa da perfusão e da velocidade do fluxo sanguíneo microvascular da pele nos camundongos HEM. A inibição do inflamassoma NLRP3 pela molécula MCC950 reduziu a contagem de monócitos e neutrófilos com caspase-1 ativada, diminuiu leucócitos em rolamento e aderidos à parede dos vasos, e reverteu a diminuição da perfusão da microvasculatura. A inibição seletiva da caspase-1 com YVAD também resultou na melhora do fluxo sanguíneo e na redução do recrutamento de leucócitos à parede vascular. Nenhum dos tratamentos resultaram na diminuição significativa da liberação de TNF-α ou de IL-1β nos animais HEM. Animais em HEM Crônica apresentaram depleção significativa de Hx a partir do 14º dia, indicando uma remoção constante dessa proteína neutralizante de heme. Houve um aumento significativo nos níveis de IL-1ß e IL-18 no plasma de camundongos HEM Crônica, juntamente com aumento de monócitos e neutrófilos periféricos com caspase-1 ativada. A avaliação de macrófagos no tecido hepático indicou um aumento na população de (F4/80<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>) e de macrófagos residentes macrófagos do tecido hepático (F4/80<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>CD206<sup>-/+</sup>) com caspase-1 ativada. Análises da expressão proteica do figado de camundongos HEM Crônica revelaram um aumento significativo da expressão do sensor NLRP3, e reduções das expressões de subunidades inativada e clivadas (subunidades p15 e p20) de capase-1, sem alterações na expressão de IL-1β imatura ou clivada. Por fim, com intuito de entender melhor o papel do endotélio no processamento de IL-1  $\beta$  induzido por hemólise, experimentos feitos in vitro com células endoteliais HUVECs confirmaram que o heme induz o aumento da expressão das moléculas de adesão ICAM-1, VCAM-1 e E-selectina, e liberação de IL-1β, IL-8 e MCP1, em associação com a indução da atividade de caspase-1. Além disso, a incubação das células HUVEC com heme resultou no aumento da expressão gênica de CASP1, sem afetar a expressão de RNAm de NLRP3, PYCARD, IL1B e IL18. Demostramos, de forma inédita, que o heme provoca a liberação da alarmina S100A8 pelas HUVECs. Surpreendentemente, essa alarmina, quando incubada isoladamente com as HUVEC, induziu a ativação dessas células, com aumento na produção de IL-1β, IL-6 e MCP-1, no entanto, S100A8 não afetou a expressão das moléculas de adesão. Ao investigarmos a resposta das células endoteliais na presença de S100A8 seguida de heme, constatamos que a S100A8 potencializou os efeitos de heme na liberação de citocinas e na expressão genica de CASP1 e PYCARD, sem afetar a expressão gênica de NLRP3, IL1B ou IL18. Em conclusão, esses resultados sugerem que tanto o inflamassoma NLRP3 quanto a atividade de caspase-1 contribuem para a inflamação vascular estéril desencadeada pela hemólise intravascular. Destaca-se que a atividade de caspase-1, e não necessariamente a citocina IL-1β, desempenha um papel significativo no recrutamento de leucócitos e na hipoperfusão que ocorrem subsequente à hemólise, indicando a caspase-1 como um potencial alvo terapêutico para atenuar os efeitos adversos decorrentes dos processos de hemólise intravascular.

Palavras-chave: Hemólise intravascular. Caspase-1. Inflamassoma NLRP3. Células endoteliais. Inflamação vascular.

### ABSTRACT

Intravascular hemolysis, or the destruction of red blood cells in the circulation, occurs in various conditions, including sickle cell anemia, pre-eclampsia, and infections. The rupture of red blood cells results in the release of damage-associated molecular patterns (DAMPs), in particular hemoglobin (Hb) and heme, which are capable of inducing sterile inflammatory processes. Studies have highlighted the involvement of the NLRP3 inflammasome in the inflammatory response to heme and other DAMPs, where the processing and release of the cytokine, IL-1β, contributes to cell activation and cell death. The aim of this study was to investigate the in vivo effects of acute and chronic intravascular hemolysis, and the role that inflammasome formation and caspase-1 activation plays in these responses, aiming to better understand the pathophysiology of diseases characterized by hemolytic inflammation. For the study, we employed two murine models to simulate intravascular hemolysis: one acute model induced by osmotic stress (HEM) and another chronic model triggered by repeated low doses of phenylhydrazine (Chronic HEM). Additionally, in vitro assays were conducted to assess the response of human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) to heme and S100A8 stimuli. The data obtained showed that induction of acute hemolysis led to an immediate and significant increase in plasma free Hb and heme levels in HEM mice. Haptoglobin (Hp), a hemoglobin scavenging protein, was reduced within the first 3 hours, indicating rapid consumption, while hemopexin (Hx), a heme scavenging protein, showed a trend towards a decrease at 3 hours after hemolysis. The plasma levels of both Hp and Hx returned to basal levels at 6 hours at intravascular hemolysis. HEM mice exhibited a significant increase in leukocytes, especially granulocytes and monocytes, at 1 and 3 hours, associated with the release of pro-inflammatory cytokines TNF-α, IL-6, IL-1β, IL-18, and S100A8. Acute intravascular hemolysis also induced an increase in peripheral monocytes (Ly6C<sup>hi</sup>CD43<sup>+</sup>) and neutrophils (Ly6G<sup>hi</sup>CD11<sup>+</sup>) with activated caspase-1 (FLICA<sup>+</sup>). Intravital microscopy analysis of the cremaster microvasculature showed an increase in rolling, adherent, and extravasated leukocytes after acute intravascular hemolysis stimulus, associated with a significant reduction in microvascular perfusion and blood flow velocity in the skin of HEM mice. Pre-administration of the NLRP3 inflammasome inhibitor, MCC950, to HEM mice reduced the activation of caspase-1 monocytes and neutrophils, decreased microvascular leukocyte recruitment, and reversed the decrease in microvascular perfusion. Selective caspase-1 inhibition with YVAD in HEM mice also improved blood flow and reduced recruitment of leukocytes to the vessel wall. Neither MCC950 nor YVAD had significant effects on TNF- $\alpha$  or IL-1 $\beta$  release in HEM animals.

Chronic HEM mice displayed significant depletion of Hx from the 14th day, indicating permanent removal of this heme-neutralizing protein. There was a significant increase in IL-1ß and IL-18 levels in the plasma of Chronic HEM mice, along with an increase in peripheral monocytes and neutrophils with activated caspase-1. Evaluation of macrophages in the hepatic tissue indicated an increase in the population of macrophages (F4/80<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>) and resident hepatic tissue macrophages (F4/80<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>CD206<sup>-</sup>/+) with activated caspase-1. Protein expression analyses in the liver of Chronic HEM mice revealed a significant increase in NLRP3 protein expression, reductions in inactive (pro-caspase-1) and cleaved caspase-1 subunit (p15 and p20) expressions, with no changes in immature or cleaved IL-1<sup>β</sup>. Finally, with the aim of investigating the role of the endothelium in hemolytic inflammation, in in vitro experiments with HUVECs confirmed that incubation of the cells with heme induces an increased expression of the adhesion molecules ICAM-1, VCAM-1, and E-selectin, induction of caspase-1 activity, and the release of IL-1β, IL-8, and MCP1. Furthermore, heme incubation resulted in an increase in CASP1 gene expression without affecting the mRNA expressions of NLRP3, PYCARD, IL1B, and IL18 in HUVECs. In a novel finding, we demonstrated that heme provoked the release of the S100A8 alarmin by HUVECs. Surprisingly, this alarmin when incubated with HUVEC alone induced the activation of these cells, as indicated by an increase in the production of IL-1β, IL-6, and MCP1; however, S100A8 did not affect the expression of adhesion molecules. When investigating the response of endothelial cells in the presence of S100A8 followed by heme, we found that S100A8 potentiated the effects of heme on cytokine release and the gene expression of CASP1 and PYCARD, without affecting the gene expression of NLRP3, IL1B, or IL18. In conclusion, these results suggest that both NLRP3 inflammasome and caspase-1 activity contribute to the sterile vascular inflammation triggered by intravascular hemolysis. Notably, caspase-1 activity, rather than necessarily cytokine IL-1β, plays a significant role in the leukocyte recruitment and subsequent hypoperfusion that occurs following hemolysis, indicating caspase-1 as a potential therapeutic target to mitigate the adverse effects arising from hemolytic processes.

Keywords: Intravascular hemolysis. Caspase-1. NLRP3 inflammasome. Endothelial cells.

Vascular inflammation.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1. CONTRIBUIÇÃO DA HEMÓLISE INTRAVASCULAR PARA A DISFUNÇÃO ENDOTELIAL. A HEMÓLISE INTRAVASCULAR GERA HEMOGLOBINA (HB) LIVRE, DESENCADEANDO REAÇÕES DE OXIDAÇÃO E O CONSUMO DE ÓXIDO NÍTRICO (NO). ALÉM DISSO, A HEMÓLISE INTRAVASCULAR LIBERA ARGINASE DOS ERITRÓCITOS, ESGOTANDO A L-ARGININA NO PLASMA, SUBSTRATO ESSENCIAL PARA A PRODUÇÃO DE NO PELA ÓXIDO NÍTRICO SINTASE ENDOTELIAL (ENOS). ESSE PROCESSO REDUZ A BIODISPONIBILIDADE DE NO, RESULTANDO EM VASOCONSTRIÇÃO, ATIVAÇÃO DE CÉLULAS ENDOTELIAIS E AGREGAÇÃO PLAQUETÁRIA. A HB OXIDADA LIBERA HEME LIVRE, QUE INDUZ A EXPRESSÃO DE MOLÉCULAS DE ADESÃO NAS CÉLULAS ENDOTELIAIS (P-SELECTINA, E-SELECTINA, VCAM-1, ICAM-1), AS QUAIS INTERAGEM COM LEUCÓCITOS E PLAQUETAS ATIVADOS. ASSIM, A HEMÓLISE INTRAVASCULAR, AO LIBERAR HB E HEME LIVRE, PROMOVE ESTRESSE OXIDATIVO E INFLAMAÇÃO, CONTRIBUINDO PARA A DISFUNÇÃO VASCULAR. FIGURA 2. FORMAÇÃO DO INFLAMASSOMA NLRP3 E ATIVAÇÃO DE CASPASE-1. AS CÉLULAS IMUNES, INCLUINDO MACRÓFAGOS E NEUTRÓFILOS, PASSAM POR UM PROCESSO DE ESTIMULAÇÃO (SINAL 1 OU PRIMING) MEDIANTE A AÇÃO DE AGONISTAS DOS RECEPTORES TRANSMEMBRANA TLR, COMO O LPS E A ALARMINA S100A8. ISSO RESULTA NA FOSFORILAÇÃO DO FATOR DE TRANSCRIÇÃO NUCLEAR NF-KB, QUE MIGRA PARA O NÚCLEO CELULAR, DESENCADEANDO A SÍNTESE DE PRÓ-IL-1B, PRÓ-IL-18 E DOS COMPONENTES DO INFLAMASSOMA (NLR, ASC E PRÓ-CASPASE-1). UM SEGUNDO SINAL (SINAL 2 – HEME, ROS, ATP, HMGB1, cristais de MSU e toxinas) ativa o sensor NLR, levando a sua oligomerização e ao recrutamento da PROTEÍNA ADAPTADORA ASC. ESTA, POR SUA VEZ, RECRUTA A PRO-CASPASE-1, FORMANDO O COMPLEXO INFLAMASSOMA E RESULTANDO NA ATIVAÇÃO DA CASPASE-1. A CASPASE-1 REALIZA A CLIVAGEM DAS FORMAS PRECURSORAS DE IL-1B E IL-18, CONVERTENDO-AS EM SUAS FORMAS BIOLOGICAMENTE ATIVAS. ADICIONALMENTE, A CASPASE-1 INDUZ A CLIVAGEM DE GASDERMINA-D, FORMANDO POROS NA MEMBRANA PLASMÁTICA CELULAR (PIROPTOSE), PERMITINDO A LIBERAÇÃO DE IL-1B E FIGURA 3. EFEITO DA INDUÇÃO DA HEMÓLISE INTRAVASCULAR AGUDA NOS NÍVEIS PLASMÁTICOS DE HEMOGLOBINA (HB) E DE HEME TOTAL EM CAMUNDONGOS C57BL6. AS DOSAGENS FORAM REALIZADAS EM AMOSTRAS DE SANGUE COLETADAS APÓS 15 MINUTOS, 1 HORA, 3 HORAS E 6 HORAS DA ADMINISTRAÇÃO INTRAVENOSA DE NACL 0,9% ESTÉRIL (CON, EM AZUL, TOTAL DE N=19), OU ÁGUA ESTÉRIL (HEM, EM BORDÔ, N=5-6). (A) HEMOGLOBINA PLASMÁTICA E (B) HEME PLASMÁTICO FORAM MENSURADOS POR TESTE COLORIMÉTRICOS DE FAIRBANKS E QUANTICHROM™, RESPECTIVAMENTE. OS RESULTADOS ESTÃO FIGURA 4. CONCENTRAÇÃO PLASMÁTICA DE HAPTOGLOBINA E HEMOPEXINA APÓS A INDUÇÃO DO PROCESSO HEMOLÍTICO INTRAVASCULAR AGUDO. AS DOSAGENS FORAM REALIZADAS EM AMOSTRAS COLETADAS APÓS 15 MINUTOS, 1 HORA, 3 HORAS E 6 HORAS DA ADMINISTRAÇÃO INTRAVENOSA DE NACL 0,9% ESTÉRIL (CON, EM AZUL; N= 10-12), OU ÁGUA ESTÉRIL (HEM, EM BORDÔ; N= 3). (A) HAPTOGLOBINA E (B) HEMOPEXINA FORAM MENSURADAS PELO MÉTODO DE ELISA. OS RESULTADOS ESTÃO EXPRESSOS COMO MÉDIAS ± SEM; VALOR DE P DETERMINADO POR TESTE DE DUNN (A) E TESTE DE BONFERRONI (B)..........47 FIGURA 5. CONTAGENS DOS NÚMEROS DE LEUCÓCITOS CIRCULANTES EM CAMUNDONGOS CONTROLE SALINA E CAMUNDONGOS submetidos a hemólise intravascular aguda. As amostras de sangue total foram coletadas após 15 minutos, 1 HORA, 3 HORAS E 6 HORAS DA ADMINISTRAÇÃO INTRAVENOSA DE NACL 0,9% ESTÉRIL (CON, EM AZUL; N= 33-35), OU ÁGUA ESTÉRIL (HEM, EM BORDÔ; N= 7-16). A CONTAGEM DE LEUCÓCITOS TOTAIS (A), GRANULÓCITOS (B) E MONÓCITOS (C) FOI REALIZADA EM CONTADOR DE CÉLULAS AUTOMATIZADO BECKMAN COULTER™ AC.T DIFF. OS RESULTADOS ESTÃO EXPRESSOS FIGURA 6. CONTAGENS E IMUNOFENOTIPAGEM DE LEUCÓCITOS CIRCULANTES DE CAMUNDONGOS CONTROLE SALINA E CAMUNDONGOS SUBMETIDOS A HEMÓLISE INTRAVASCULAR AGUDA. AS AMOSTRAS DE SANGUE TOTAL FORAM COLETADAS APÓS 15 MINUTOS, 1 HORA E 3 HORAS DA ADMINISTRAÇÃO INTRAVENOSA DE NACL 0,9% ESTÉRIL (CON, EM AZUL; N= 36), OU ÁGUA ESTÉRIL (HEM, EM BORDÔ; N= 6-22). OS ENSAIOS FORAM REALIZADOS POR CITOMETRIA DE FLUXO EM AMOSTRAS MARCADAS COM ANTI-CD11B. EM (A) AS POPULAÇÕES DE GRANULÓCITOS E MONONUCLEARES FORAM DIFERENCIADAS POR FSC x SSC, e todas as análises subsequentes foram realizadas para a identificação da frequência de células POSITIVAS PARA CD11B (B) E PARA EXPRESSÃO TOTAL DE CD11B (C). OS RESULTADOS ESTÃO EXPRESSOS COMO MÉDIAS ± FIGURA 7. AVALIAÇÃO DA LIBERAÇÃO DE MOLÉCULAS PRÓ-INFLAMATÓRIAS APÓS ESTÍMULO DE HEMÓLISE INTRAVASCULAR AGUDA. SANGUE TOTAL DOS CAMUNDONGOS FOI COLETADO 15 MINUTOS, 1 HORA, 3 HORAS, OU 6 HORAS APÓS ADMINISTRAÇÃO INTRAVENOSA DE NACL 0,9% ESTÉRIL (CON, EM AZUL), OU DE ESTÍMULO HEMOLÍTICO (HEM, EM BORDÔ) PARA OBTENÇÃO DE PLASMA E QUANTIFICAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE TNF-A (A: CON N= 16; HEM N= 4-10), DE IL-6 (B: CON N= 8; HEM N= 3), E DA ALARMINA S100A8 (C: CON N= 9; HEM N= 6), FORAM REALIZADAS POR ELISA. OS RESULTADOS ESTÃO EXPRESSOS 

FIGURA 10. AVALIAÇÃO DO EFEITO DA HEMÓLISE INTRAVASCULAR AGUDA NA ATIVAÇÃO DE CASPASE-1 EM NEUTRÓFILOS E MONÓCITOS MURINOS. OS ENSAIOS FORAM REALIZADOS POR CITOMETRIA DE FLUXO A PARTIR DE SANGUE TOTAL COLETADO APÓS 15 MINUTOS (A-B) OU 1 HORA (C-D) DA ADMINISTRAÇÃO INTRAVENOSA DE NACL 0,9% ESTÉRIL (CON, EM AZUL; N= 6-9), OU DE ESTÍMULO HEMOLÍTICO (HEM, EM BORDÔ, N= 6-8). PARA IDENTIFICAÇÃO DE NEUTRÓFILOS FOI UTILIZADO ANTICORPOS ANTI-LY6G-APC E ANTI-CD11B-PE (A, C); OU ANTI-LY6C-APC E ANTI-CD43-PE PARA IDENTIFICAÇÃO DE MONÓCITOS (B, D); E FAM-YVAD-FLICA-FITC PARA IDENTIFICAÇÃO DE CASPASE-1 ATIVA, E ANALISADOS POR CITOMETRIA DE FLUXO. OS RESULTADOS ESTÃO EXPRESSOS COMO MÉDIAS ± SEM; VALOR DE P DETERMINADO POR TESTE DE MANN-WHITNEY.

FIGURA 11. AVALIAÇÃO DO EFEITO DO INIBIDOR DE INFLAMASSOMA NLRP3 (MCC950) IN VIVO NA ATIVAÇÃO DE CASPASE-1 DE

FIGURA 13. EFEITO DO INIBIDOR DE INFLAMASSOMA NLRP3 (MCC) NO RECRUTAMENTO E ADESÃO DE LEUCÓCITOS AO ENDOTÉLIO MICROVASCULAR DE CAMUNDONGOS SUBMETIDOS A HEMÓLISE INTRAVASCULAR AGUDA. OS CAMUNDONGOS FORAM PREVIAMENTE TRATADOS POR 1 HORA COM MCC950 (50 Mg/Kg, I.P.; COLUNAS PREENCHIDAS EM PONTOS - MCC) OU COM VEÍCULO (PBS ESTÉRIL, COLUNAS VAZIAS). A TÉCNICA DE MICROSCOPIA INTRAVITAL FOI REALIZADA NO MUSCULO CREMASTER APÓS 15 MINUTOS DA ADMINISTRAÇÃO INTRAVENOSA DE NACL 0,9% ESTÉRIL (CON, EM AZUL, N= 4), OU DE ESTÍMULO HEMOLÍTICO (HEM, EM BORDÔ, N= 4). OS RESULTADOS ESTÃO EXPRESSOS COMO MÉDIAS ± SEM DE TOTAL DE 6 - 8 VÊNULAS ANALISADAS POR ANIMAL. VALOR DE P DETERMINADO POR TESTE DE HOLM-ŠÍDÁK EM (A); ŠÍDÁK EM (B) E DE DUNN EM (C).

FIGURA 14. IMAGENS REPRESENTATIVAS DE VÊNULAS DA MICROCIRCULAÇÃO DO MÚSCULO CREMASTER DE CAMUNDONGOS C57BL6 APÓS 15 MINUTOS DA ADMINISTRAÇÃO INTRAVENOSA DE NACL 0,9% ESTÉRIL (CON), OU DE ESTÍMULO HEMOLÍTICO (HEM). OS ANIMAIS FORAM PREVIAMENTE TRATADOS POR 1 HORA COM MCC950 (50MG/KG, I.P.) OU COM VEÍCULO (PBS ESTÉRIL). OS LEUCÓCITOS ADERIDOS SÃO MOSTRADOS NAS IMAGENS COM ASTERISCOS PRETOS (\*). MICROSCOPIA INTRAVITAL EM AUMENTO DE 63X, BARRA INDICA ESCALA DE 20 μM. FIGURA 15. CONCENTRAÇÃO PLASMÁTICA DE TNF-A E IL-B DE CAMUNDONGOS SUBMETIDOS A HEMÓLISE INTRAVASCULAR AGUDA APÓS TRATAMENTO COM INIBIDOR DE INFLAMASSOMA NLRP3 (MCC950). OS CAMUNDONGOS FORAM PREVIAMENTE TRATADOS POR 1 HORA COM MCC950 (50 MG/KG; COLUNAS PREENCHIDAS EM PONTOS - MCC) OU COM VEÍCULO (PBS ESTÉRIL, COLUNAS VAZIAS). SANGUE TOTAL DOS CAMUNDONGOS FOI COLETADO 1 HORA APÓS ADMINISTRAÇÃO INTRAVENOSA DE NACL 0,9% ESTÉRIL (CON, EM AZUL), OU DE ESTÍMULO HEMOLÍTICO (HEM, EM BORDÔ) PARA OBTENÇÃO DE PLASMA E QUANTIFICAÇÃO POR ELISA DA CONCENTRAÇÃO DE TNF-A (A: CON N= 2-3; HEM N= 4-5) E DE IL-B (B: CON N= 4-5; HEM N= 7-8). OS RESULTADOS ESTÃO EXPRESSOS COMO MÉDIAS ± SEM; VALOR DE P DETERMINADO POR TESTE DE DUNN (A) E FIGURA 16. AVALIAÇÃO DO EFEITO DO INIBIDOR DE CASPASE-1 (YVAD) IN VIVO NA ATIVAÇÃO DE CASPASE-1 DE NEUTRÓFILOS E MONÓCITOS MURINOS INDUZIDA PELA HEMÓLISE INTRAVASCULAR AGUDA. OS CAMUNDONGOS FORAM PREVIAMENTE TRATADOS POR 1 HORA COM YVAD (8 MG/KG, I.P.; COLUNAS PREENCHIDAS EM PONTOS -YVAD) OU COM VEÍCULO DMSO (0,5% EM PBS estéril, colunas vazias). Os ensaios foram realizados por citometria de fluxo a partir de sangue total COLETADO APÓS 1 HORA DA ADMINISTRAÇÃO INTRAVENOSA DE NACL 0,9% ESTÉRIL (CON, EM AZUL; N= 4-5), OU DE ESTÍMULO HEMOLÍTICO (HEM, EM BORDÔ; N= 5-7). PARA A IDENTIFICAÇÃO DE NEUTRÓFILOS FOI UTILIZADO ANTICORPOS ANTI-LY6G-APC E ANTI-CD11B-PE (A); PARA IDENTIFICAÇÃO DE MONÓCITOS ANTI-LY6C-APC E ANTI-CD43-PE (B); E FAM-YVAD-FLICA-FITC PARA IDENTIFICAÇÃO DE CASPASE-1 ATIVA, POR CITOMETRIA DE FLUXO. OS RESULTADOS ESTÃO EXPRESSOS COMO MÉDIAS ± SEM; VALOR DE P DETERMINADO POR TESTE DE ŠÍDÁK. .....66 FIGURA 17. EFEITO DO INIBIDOR DE CASPASE-1 (YVAD) NO FLUXO SANGUÍNEO MICROVASCULAR PERIFÉRICO DE CAMUNDONGOS C57BL6 SUBMETIDOS À HEMÓLISE INTRAVASCULAR AGUDA. OS CAMUNDONGOS FORAM PREVIAMENTE TRATADOS POR 1 HORA COM YVAD (8 MG/KG, I.P.; COLUNAS PREENCHIDAS EM PONTOS - YVAD) OU COM VEÍCULO DMSO (0,5% EM PBS ESTÉRIL, COLUNAS VAZIAS). A TÉCNICA NÃO INVASIVA LASER DOPPLER FOI UTILIZADA PARA MENSURAR O FLUXO SANGUÍNEO MICROCIRCULATÓRIO NO MEMBRO PÉLVICO DE CAMUNDONGOS ANESTESIADOS APÓS 15 MINUTOS DA ADMINISTRAÇÃO INTRAVENOSA DE NACL 0,9% ESTÉRIL (CON, EM AZUL, N= 6), OU DE ESTÍMULO HEMOLÍTICO (HEM, EM BORDÔ, N= 6-8). OS DADOS NORMALIZADOS REPRESENTAM OS VALORES ABSOLUTOS CORRIGIDOS PELA MÉDIA ARBITRÁRIA BASAL (SEM ESTÍMULOS) DE CADA ANIMAL. OS RESULTADOS ESTÃO EXPRESSOS COMO MÉDIAS ± SEM; VALOR DE P DETERMINADO POR TESTE DE FIGURA 18. EFEITO DO INIBIDOR DE CASPASE-1 (YVAD) NO RECRUTAMENTO E ADESÃO DE LEUCÓCITOS AO ENDOTÉLIO MICROVASCULAR DE CAMUNDONGOS SUBMETIDOS A HEMÓLISE INTRAVASCULAR AGUDA. OS CAMUNDONGOS FORAM PREVIAMENTE TRATADOS POR 1 HORA COM YVAD (8 MG/KG, I.P.; COLUNAS PREENCHIDAS EM PONTOS - YVAD) OU COM VEÍCULO DMSO (0,5% EM PBS ESTÉRIL, COLUNAS VAZIAS). A TÉCNICA DE MICROSCOPIA INTRAVITAL FOI REALIZADA NO MUSCULO CREMASTER APÓS 15 MINUTOS DA ADMINISTRAÇÃO INTRAVENOSA DE NACL 0,9% ESTÉRIL (CON, EM AZUL, N= 4), OU DE ESTÍMULO HEMOLÍTICO (HEM, EM BORDÔ, N= 4). OS DADOS NORMALIZADOS REPRESENTAM OS VALORES ABSOLUTOS CORRIGIDOS PELA MÉDIA ARBITRÁRIA BASAL (SEM ESTÍMULOS) DE CADA ANIMAL. OS RESULTADOS ESTÃO EXPRESSOS COMO médias ± SEM; valor de P determinado por teste de Bonferroni......70 FIGURA 19. IMAGENS REPRESENTATIVAS DE VÊNULAS DA MICROCIRCULAÇÃO DO MÚSCULO CREMASTER DE CAMUNDONGOS C57BL6 APÓS 15 MINUTOS DA ADMINISTRAÇÃO INTRAVENOSA DE NACL 0,9% ESTÉRIL (CON), OU DE ESTÍMULO HEMOLÍTICO (HEM). OS ANIMAIS FORAM PREVIAMENTE TRATADOS POR 1 HORA COM YVAD (8 MG/KG, I.P.) OU COM VEÍCULO DMSO (0,5% EM PBS estéril). Os leucócitos aderidos são mostrados nas imagens com asteriscos pretos (\*). Microscopia INTRAVITAL EM AUMENTO DE 63X, barra indica escala de  $20\,\mu$ M. ......71 FIGURA 20. EFEITO DO INIBIDOR DE CASPASE-1 (YVAD) NA CONCENTRAÇÃO PLASMÁTICA DE TNF-A E IL-B DE CAMUNDONGOS SUBMETIDOS A HEMÓLISE INTRAVASCULAR AGUDA. OS CAMUNDONGOS FORAM PREVIAMENTE TRATADOS POR 1 HORA COM YVAD (8 MG/KG; COLUNAS PREENCHIDAS EM PONTOS - YVAD) OU COM VEÍCULO DMSO (0,5% EM PBS ESTÉRIL, COLUNAS VAZIAS). SANGUE TOTAL DOS CAMUNDONGOS FOI COLETADO 1 HORA APÓS ADMINISTRAÇÃO INTRAVENOSA DE NACL 0,9% ESTÉRIL (CON, EM AZUL), OU DE ESTÍMULO HEMOLÍTICO (HEM, EM BORDÔ) PARA OBTENÇÃO DE PLASMA E QUANTIFICAÇÃO, POR ELISA, DA CONCENTRAÇÃO DE TNF-A (A: CON N= 5; HEM N= 5-8), DE IL-B (B: CON N= 4-5; HEM N= 7-8). OS RESULTADOS ESTÃO EXPRESSOS COMO MÉDIAS ± SEM; VALOR DE P DETERMINADO POR TESTE DE BONFERRONI (A) E TUKEY (B). FIGURA 21. CONCENTRAÇÃO DOS NÍVEIS PLASMÁTICOS DE HEMOPEXINA EM CAMUNDONGOS TRATADOS COM BAIXA DOSE DE FENILHIDRAZINA (PHZ, I.P., 10 MG/KG, 3X/SEMANA, A CADA 48 HORAS, POR 28 DIAS). A QUANTIFICAÇÃO FOI REALIZADA POR ELISA EM AMOSTRAS DE PLASMA COLETADAS EM CADA DIA CONFORME INDICADO NO GRÁFICO, APÓS 48 HORAS DA ÚLTIMA ADMINISTRAÇÃO DE (PHZ – HEMÓLISE CRÔNICA) OU NACL 0,9% (SALINA – ANIMAIS CONTROLE). OS RESULTADOS ESTÃO EXPRESSOS COMO MÉDIAS ± SEM; VALOR DE P DETERMINADO POR TESTE DE TESTE T, N=3......74 FIGURA 24. EFEITO DA HEMÓLISE INTRAVASCULAR CRÔNICA NO FENÓTIPO DE MACRÓFAGOS MURINOS. O ENSAIO DE CITOMETRIA FOI REALIZADO EM SUSPENSÕES DE CÉLULAS HEPÁTICAS NÃO-PARÊNQUIMAIS OBTIDAS DE TECIDOS COLETADOS 48 HORAS APÓS A ÚLTIMA ADMINISTRAÇÃO INTRAPERITONEAL DE NACL 0,9% ESTÉRIL (CON, EM AZUL, N = 13 EM A; N= 6 EM B; E N= 8 EM C), OU DE FENILHIDRAZINA (PHZ, 10 MG/KG, 3X/SEMANA/28 DIAS – HEM CRÔNICA, EM VERMELHO, N = 14 EM A; N= 6 EM B; E N= 7 EM C). PARA IDENTIFICAÇÃO DE CÉLULAS NÃO- PARENQUIMAIS (NPCS), A SUSPENSÃO CELULAR FOI INCUBADA COM OS ANTICORPOS ANTI-F4/80-PE, ANTI-CD11B-PERCP (A), E PARA CÉLULAS DE KUPFFER (KC) ANTI-F4/80-PE, ANTI-CD11B-PERCP E ANTI-CD206-APC (B, C). OS RESULTADOS ESTÃO EXPRESSOS COMO MÉDIAS ± SEM; VALOR DE P DETERMINADO POR TESTE MANN-WHITNEY (A) E TESTE T (B-C).

FIGURA 25. EFEITO DA HEMÓLISE INTRAVASCULAR CRÔNICA NA ATIVAÇÃO DE CASPASE-1 DE MACRÓFAGOS MURINOS E CONCENTRAÇÃO TECIDUAL DE IL-1B. O ENSAIO DE CITOMETRIA FOI REALIZADO EM SUSPENSÕES DE CÉLULAS HEPÁTICAS OBTIDAS DE TECIDOS COLETADOS APÓS 48 HORAS APÓS A ÚLTIMA ADMINISTRAÇÃO DE NACL 0,9% ESTÉRIL (CON, EM AZUL, N= 6-8), OU DE FENILHIDRAZINA (PHZ, 10 MG/KG, 3X/SEMANA/28 DIAS – HEM CRÔNICA, EM VERMELHO, N= 6). PARA IDENTIFICAÇÃO DE CÉLULAS NÃO- PARENQUIMAIS (NPCS), A SUSPENSÃO CELULAR FOI INCUBADA COM OS ANTICORPOS ANTI-F4/80-PE, ANTI-CD11B-PERCP (A), E PARA CÉLULAS DE KUPFFER (KC) ANTI-F4/80-PE, ANTI-CD11B-PERCP E ANTI-CD206-APC (B, C); E FAM-YVAD-FLICA-FITC PARA IDENTIFICAÇÃO DE CASPASE-1 ATIVA POR CITOMETRIA DE FLUXO. (D) OS NÍVEIS DE CITOCINA IL-1B FORAM MEDIDOS POR ELISA A PARTIR DE HOMOGENEIZADOS HEPÁTICOS E OS VALORES OBTIDOS FORAM CORRIGIDOS PELA CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNAS TOTAL, ANTERIORMENTE QUANTIFICADO POR BRADFORD (CON, N= 3; HEM CRÔNICA, N= 4). OS RESULTADOS ESTÃO EXPRESSOS COMO MÉDIAS ± SEM; VALOR DE P DETERMINADO POR TESTE T.

FIGURA 27. AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE MOLÉCULAS DE ADESÃO DE CÉLULAS ENDOTELIAIS DE CORDÃO UMBILICAL HUMANO (HUVECS) ESTIMULADAS COM HEME. AS CÉLULAS (2x10<sup>5</sup>) FORAM CULTIVADAS EM MEIO F12K SUPLEMENTADO COM 2% DE SORO FETAL BOVINO (SFB) POR 3 HORAS NA PRESENÇA DE HEME (25 – 100 μM) OU NA AUSÊNCIA DOS ESTÍMULOS (BASAL) A 37°C, EM 5% DE CO<sub>2</sub>. A PORCENTAGEM DE HUVECS QUE EXPRESSAM ICAM-1, VCAM-1 E E-SELECTINA FORAM AVALIADAS POR CITOMETRIA DE FLUXO. OS RESULTADOS ESTÃO EXPRESSOS COMO MÉDIAS ± SEM PARA CULTURAS EM DUPLICATAS OU TRIPLICATAS E SÃO REPRESENTATIVOS DE 6 A 9 EXPERIMENTOS INDEPENDENTES. VALOR DE P DETERMINADO POR TESTE DE ŠÍDÁK.

FIGURA 28. AVALIAÇÃO DA LIBERAÇÃO DE MOLÉCULAS PRÓ-INFLAMATÓRIAS DE CÉLULAS ENDOTELIAIS DE CORDÃO UMBILICAL HUMANO (HUVECS) ESTIMULADAS COM HEME. AS CÉLULAS (2x10<sup>5</sup> CÉLULAS/ML) FORAM CULTIVADAS EM MEIO F12K SUPLEMENTADO COM 2% SFB POR 3 HORAS NA PRESENÇA DE HEME (25 - 100μM) OU NA AUSÊNCIA DE ESTÍMULO (BASAL), A 37C° EM 5% DE CO<sub>2</sub>. A MENSURAÇÃO DE S100A8 (A), INTERLEUCINA (IL)-6 (B), IL-8 (C) E MCP-1 (D) NO SOBRENADANTE

FOI REALIZADA POR ELISA. OS RESULTADOS ESTÃO EXPRESSOS COMO MÉDIAS ± SEM, REPRESENTATIVOS DE DUPLICATAS OU TRIPLICATAS DE 5 CULTURAS INDEPENDENTES. VALOR DE P FOI DETERMINADO POR TESTE DE BONFERRONI EM (A: BASAL N= 14, Heme 25 μM n= 10, Heme 50 μM n= 18, Heme 100 μM n= 5); ου teste de Šídák em (B: Basal n= 6, Heme 25 μM n= 7, HEME 50 μM N= 7, HEME 100 μM N= 5); (C: BASAL N= 6, HEME 25 μMN = 5, HEME 50 μM N= 6, HEME 100 μM N= 4); (D: Basal n= 6, Heme 25 μM n= 7, Heme 50 μM n= 6, Heme 100 μM n= 5)......87 FIGURA 29. VIABILIDADE DE CÉLULAS ENDOTELIAIS DE CORDÃO UMBILICAL HUMANO (HUVECS) ESTIMULADAS COM HEME. AS células (2x10<sup>5</sup> células/mL) foram cultivadas em meio F12K suplementado com 2% SFB por 20 horas na presença de heme  $(25 - 100 \mu M)$  ou na ausência de estímulo (Basal), a 37°C em 5% de CO<sub>2</sub>. A formação de FORMAZAN FOI MENSURADO POR ABSORBÂNCIA A 490NM APÓS INCUBAÇÃO COM MTS POR 150 MINUTOS A 37°C. OS RESULTADOS ESTÃO EXPRESSOS COMO MÉDIAS ± SEM REPRESENTATIVOS DE TRIPLICATAS DE 4 CULTURAS INDEPENDENTES. FIGURA 30. AVALIAÇÃO DE CASPASE-1 ATIVA EM CÉLULAS ENDOTELIAIS DE CORDÃO UMBILICAL HUMANO (HUVECS) ESTIMULADAS COM HEME. AS CÉLULAS (2x10<sup>5</sup> CÉLULAS) FORAM CULTIVADAS EM MEIO F12K SUPLEMENTADO COM 2% SFB (SORO FETAL bovino) por 3 horas na presença de heme (A: 25 μM a 100 μM; ou B: 50 μM) ou na ausência de estímulo (Basal) a 37ºC, EM 5% DE CO₂. (A) A PORCENTAGEM DE HUVECS COM CASPASE-1 ATIVA FOI IDENTIFICADA PELA SONDA FLUORESCENTE FAM-YVAD-FLICA-FITC POR CITOMERIA DE FLUXO. (B) A QUANTIFICAÇÃO DE IL-B FOI REALIZADA EM SOBRENADANTE DAS CULTURAS ATRAVÉS DE ELISA. OS RESULTADOS ESTÃO EXPRESSOS COMO MÉDIAS ± SEM, REPRESENTATIVOS DE DUPLICATAS OU TRIPLICATAS DE 9 CULTURAS INDEPENDENTES. VALOR DE P DETERMINADO POR TESTE DE FIGURA 31. EFEITO DO HEME NA INDUÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA DE CASPASE-1 DE PROTEÍNAS DO INFLAMASSOMA EM CÉLULAS ENDOTELIAIS DE CORDÃO UMBILICAL HUMANO (HUVECS). AS CÉLULAS (2x10<sup>5</sup> CÉLULAS) FORAM CULTIVADAS EM MEIO F12K suplementado com 2% SFB (soro fetal bovino) por 3 horas na presença de heme (50  $\mu$ M), ou na ausência de ESTÍMULO (BASAL) A 37ºC, EM 5% DE CO2. A EXPRESSÃO DE MRNA DE CASP1 (A: N= 8), PYCARD (B: N= 6), NLRP3 (C: N= 8), IL18 (D: N= 6) E DE IL1B (E: N= 2) FOI DETERMINADA POR PCR QUANTITATIVA E NORMALIZADAS PELOS GENES RECONSTITUTIVOS B-ACTINA E GAPDH UTILIZANDO GNORM SOFTWARE. OS RESULTADOS ESTÃO EXPRESSOS COMO MÉDIAS ± SEM de culturas em duplicatas e são representativos de ≤ 5 experimentos independentes. Valor de P DETERMINADO POR TESTE DE WILCOXON (A) E TESTE T (B-E)......90 FIGURA 32. EFEITOS DA S100A8 NA ATIVAÇÃO DE CÉLULAS ENDOTELIAIS DE CORDÃO UMBILICAL HUMANO (HUVECS) INDUZIDA POR HEME. AS HUVECS (2x10<sup>5</sup> células) foram incubadas na ausência dos estímulos (Basal) ou na presença de heme (50 μM) por 3 horas, ou pré-estimuladas com S100A8 (1 μg/mL) por 3 horas antes da incubação com heme, em MEIO F12K SUPLEMENTADO COM SFB 2%, A 37ºC, EM 5% DE CO2. AS PORCENTAGENS DE HUVECS QUE EXPRESSAM ICAM-1, VCAM-1 E E-SELECTINA FORAM AVALIADAS POR CITOMETRIA DE FLUXO. OS RESULTADOS ESTÃO EXPRESSOS COMO MÉDIAS ± SEM, REPRESENTATIVOS DE DUPLICATAS OU TRIPLICATAS DE 8 A 9 CULTURAS INDEPENDENTES. VALOR DE P DETERMINADO POR FIGURA 33. PRODUÇÃO DE MOLÉCULAS PRÓ-INFLAMATÓRIAS POR CÉLULAS ENDOTELIAIS DE CORDÃO UMBILICAL HUMANO (HUVECS) APÓS ESTÍMULOS COM S100A8 E HEME. AS HUVECS (2x10<sup>5</sup> CÉLULAS) FORAM INCUBADAS NA AUSÊNCIA DOS ESTÍMULOS (BASAL) OU NA PRESENÇA DE HEME (50 μM) POR 3 HORAS, OU PRÉ-ESTIMULADAS COM S100A8 (1μg/ML) POR 3 HORAS ANTES DA INCUBAÇÃO COM HEME POR MAIS 3 HORAS EM MEIO F12K SUPLEMENTADO COM SFB 2%, A 37°C, EM 5% DE CO2. AS MENSURAÇÕES DE IL-8 (A), IL-6 (B) E MCP-1 (C) NO SOBRENADANTE DE DIFERENTES CULTURAS EM DUPLICATAS (A; N =6-12), (B-C; N =6-14) FORAM REALIZADAS POR ELISA. OS RESULTADOS ESTÃO EXPRESSOS COMO MÉDIAS ± SEM, REPRESENTATIVOS DE DUPLICATAS OU TRIPLICATAS DE 5 CULTURAS INDEPENDENTES. VALOR DE P DETERMINADO POR TESTE DE Šídák em (A) e Holm-Šídák em (B-C). ......94 FIGURA 34. AVALIACAO DA PRODUÇÃO DE IL-1B E ATIVAÇÃO DE CASPASE-1 EM CÉLULAS ENDOTELIAIS DE CORDÃO UMBILICAL HUMANO (HUVECs) NA PRESENÇA DE S100A8 E HEME. AS HUVECS (2x10<sup>5</sup> células) foram incubadas na ausência dos estímulos (Basal) ou na presença de heme (50  $\mu$ M) por 3 horas, ou pré-estimuladas com S100A8 (1  $\mu$ G/ML) por 3 HORAS ANTES DA INCUBAÇÃO COM HEME POR MAIS 3 HORAS. AS INCUBAÇÕES FORAM CONDUZIDAS EM MEIO F12K SUPLEMENTADO COM 2% SFB, A 37ºC, EM 5% DE CO₂. (A) A QUANTIFICAÇÃO POR ELISA DE IL-B FOI REALIZADA EM SOBRENADANTE DE CULTURAS INDEPENDENTES EM DUPLICATAS. (B) A PORCENTAGEM DE HUVECS COM CASPASE-1 ATIVA FOI IDENTIFICADA PELA SONDA FLUORESCENTE FAM-YVAD-FLICA-FITC ATRAVÉS DE CITOMETRIA DE FLUXO. OS RESULTADOS ESTÃO EXPRESSOS COMO MÉDIAS ± SEM, E SÃO REPRESENTATIVOS DE 8 CULTURAS INDEPENDENTES. VALOR DE P DETERMINADO POR TESTE DE HOLM-ŠÍDÁK EM (A: BASAL N= 17; S100A8 N= 6; HEME 50 μM N= 16; S100A8 + HEME 50  $\mu$ M n= 9) ε teste Šídák em (B: Basal ε Heme 50  $\mu$ M n= 16; S100A8 n= 15; S100A8 + Heme 50  $\mu$ M n= 18)...........96 FIGURA 36. CONTRIBUIÇÃO DO INFLAMASSOMA NLRP3 E DA ATIVIDADE DE CASPASE-1 NOS PROCESSOS DE INFLAMAÇÃO VASCULAR EM RESPOSTA À HEMÓLISE INTRAVASCULAR. À RUPTURA DAS HEMÁCIAS RESULTA NA LIBERAÇÃO IMEDIATA DE HEMOGLOBINA (HB) E HEME NO ESPAÇO INTRAVASCULAR. O HEME EXTRACELULAR INDUZ A ATIVAÇÃO DE CÉLULAS ENDOTELIAIS (EC) E A LIBERAÇÃO DE S100A8 ENDOTELIAL. A ALARMINA S100A8, QUE TAMBÉM PODE SER LIBERADA POR LEUCÓCITOS ATIVADOS, PREPARA A EC (PRIMING DE CASP1 E PYCARD) PARA A ATIVAÇÃO DE CASPASE-1 POR HEME. ESSE PROCESSO AMPLIFICA A LIBERAÇÃO DE IL-1B DAS ECS, POTENCIALIZANDO A INFLAMAÇÃO VASCULAR. A FORMAÇÃO DO INFLAMASSOMA NLRP3 CONTRIBUI PARA A ADESÃO DE LEUCÓCITOS AO ENDOTÉLIO ATIVADO.  ${\sf A}$  ATIVAÇÃO DE CASPASE- ${\sf 1}$  DE NEUTRÓFILOS ( ${\sf NEUT}$ ) E MONÓCITOS (MONOC.) POTENCIALIZA O RECRUTAMENTO DE LEUCÓCITOS NA MICROVASCULATURA, INDUZINDO O ROLAMENTO E ATIVAÇÃO DESSAS CÉLULAS, RESULTANDO NA REDUÇÃO DA VELOCIDADE DAS CÉLULAS E COMPROMETENDO A PERFUSÃO SANGUÍNEA TECIDUAL. DURANTE A HEMÓLISE CRÔNICA, A FORMAÇÃO DO INFLAMASSOMA NLRP3 NO TECIDO HEPÁTICO E ATIVIDADE DE CASPASE-1 EM CÉLULAS DE KUPFFER (KC) NO FÍGADO, E DE NEUTRÓFILOS E MONÓCITOS NO SANGUE PERIFÉRICO CONTRIBUEM PARA A LIBERAÇÃO SISTÊMICA DE IL-18 E IL-18......115 FIGURA 37. REPRESENTAÇÃO DA ESTRATÉGIA DE GATE UTILIZADA PARA AVALIAÇÃO DE CASPASE-1 ATIVA (FLICA<sup>+</sup>) EM NEUTRÓFILOS E MONÓCITOS DE CAMUNDONGOS C57BL6. AS ESTIMATIVAS DE TAMANHO (FORWARD SCATTER -FSC) E GRANULOSIDADE (SIDE SCATTER -SSC) FORAM APLICADAS EM LISADO DE SANGUE TOTAL PARA IDENTIFICAR AS POPULAÇÕES ESPECÍFICAS DE GRANULÓCITOS E CÉLULAS MONONUCLEARES, QUE POSTERIORMENTE FORAM DISTINGUIDAS EM NEUTRÓFILOS E MONÓCITOS PELA EXPRESSÃO RELATIVA DOS MARCADORES DE SUPERFÍCIE. A AQUISIÇÃO FOI REALIZADA NO CITÔMETRO DE FLUXO FIGURA 38. REPRESENTAÇÃO DA ESTRATÉGIA DE GATE UTILIZADA PARA AVALIAÇÃO DE CASPASE-1 ATIVA (FLICA<sup>+</sup>) EM CÉLULAS DE Kuppfer (macrófagos de tecido hepático) de camundongos C57BL6. As estimativas de tamanho (Forward SCATTER -FSC) E GRANULOSIDADE (SIDE SCATTER -SSC) FORAM APLICADAS EM SUSPENSÃO CELULAR DO FÍGADO PARA IDENTIFICAR AS POPULAÇÕES ESPECÍFICAS DE CÉLULAS NÃO-PARENQUIMAIS (NPCS), QUE POSTERIORMENTE FORAM

- FIGURA 41. CONTAGEM E IMUNOFENOTIPAGEM DE LEUCÓCITOS DE CAMUNDONGOS CONTROLE SALINA E CAMUNDONGOS
   SUBMETIDOS A HEMÓLISE INTRAVASCULAR AGUDA. ÁS AMOSTRAS DE SANGUE TOTAL FORAM COLETADAS APÓS 15 MINUTOS, 1
   HORA E 3 HORAS DA ADMINISTRAÇÃO INTRAVENOSA DE NACL 0,9% ESTÉRIL (CON, EM AZUL; N= 36), OU ÁGUA ESTÉRIL
   (HEM, EM BORDÔ; N= 6-22). OS ENSAIOS FORAM REALIZADOS POR CITOMETRIA DE FLUXO EM AMOSTRAS MARCADAS COM
   ANTI-CD11B. AS POPULAÇÕES DE GRANULÓCITOS E DE MONONUCLEARES FORAM DIFERENCIADOS POR FSC x SSC, E AS
   ANÁLISES SUBSEQUENTES FORAM REALIZADAS PARA A IDENTIFICAÇÃO DA FREQUÊNCIA EM PORCENTAGEM DE CÉLULAS CD11B<sup>LIOW</sup>
   (A) OU CD11B<sup>HIGH</sup>
   (B), OU PARA A QUANTIFICAÇÃO TOTAL DA INTENSIDADE MÉDIA DE FLUORESCÊNCIA (MFI) DA EXPRESSÃO

CD11B LOW (C) OU CD11B HIGH (D). OS RESULTADOS ESTÃO EXPRESSOS COMO MÉDIAS ± SEM; VALOR DE P DETERMINADO FIGURA 42. EFEITO DA UMA ÚNICA ADMINISTRAÇÃO DE FENILHIDRAZINA (PHZ) NA EXPRESSÃO HEPÁTICA DE NLRP3 E FORMAS PRECURSORAS E CLIVADAS DE IL-1B E CASPASE-1. OS HOMOGENATOS DE FÍGADO FORAM ANALISADOS POR WESTERN BLOT PARA AVALIAÇÃO DA A EXPRESSÃO DO INFLAMASSOMA NLRP3 (A), PRÓ-IL-1B (B) E IL-1B CLIVADA (SUBUNIDADE P15; C) E DE PRÓ-CASPASE-1(PRO CASP-1; E) E ATIVA (CASP-1 SUBUNIDADE P20 E P15;F E G). O EXTRATO TOTAL DOS FÍGADOS DOS CAMUNDONGOS FORAM COLETADOS APÓS 48 HORAS APÓS DA ÚNICA DOSE (ÚNICA) DE PHZ (10MG/KG) OU SALINA (NACL 0,9%). As densidades de banda foram normalizadas usando a expressão GAPDH de cada amostra. Em (D) Os NÍVEIS DE CITOCINA IL-1B FORAM MENSURADOS POR ELISA A PARTIR DE HOMOGENEIZADOS HEPATICO. OS VALORES OBTIDOS FORAM CORRIGIDOS PELA CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNAS TOTAL, ANTERIORMENTE QUANTIFICADO POR BRADFORD. OS RESULTADOS ESTÃO EXPRESSOS COMO MÉDIAS ± SEM E FORAM DETERMINADOS POR TESTE T DE STUDENT. OS RESULTADOS INDICAM QUE, EM COMPARAÇÃO COM O GRUPO SUBMETIDO À HEMÓLISE CRÔNICA (HEM CRÔNICA), UMA ÚNICA DOSE DE PHZ NÃO AFETOU A EXPRESSÃO DE NLRP3 NO FÍGADO DOS CAMUNDONGOS C57BL6. POR OUTRO LADO, ESSA ÚNICA DOSE RESULTOU EM UMA REDUÇÃO SIGNIFICATIVA TANTO NAS FORMAS PRECURSORAS QUANTO NAS CLIVADAS DE IL-1B E CASPASE-1, DIFERENÇAS QUE NÃO FORAM TOTALMENTE EVIDENTES NOS ANIMAIS DO GRUPO HEM CRÔNICA. DE MANEIRA ANÁLOGA AO GRUPO HEM CRÔNICA, NÃO FORAM OBSERVADAS VARIAÇÕES SIGNIFICATIVAS NA CONCENTRAÇÃO HEPÁTICA DE IL-1B SOLÚVEL. FIGURA 43. PRODUÇÃO E LIBERAÇÃO DE CITOCINAS PRÓ-INFLAMATÓRIAS (A E B) E DE CASPASE-1 ATIVADA (C E D) NA HEMÓLISE INTRAVASCULAR CRÔNICA INDUZIDA POR PHZ. (A E B) CONCENTRAÇÃO DOS NÍVEIS PLASMÁTICOS DE IL-1B E IL-18 DE CAMUNDONGOS 48 HORAS APÓS UMA (ÚNICA) ADMINISTRAÇÃO DE FENILHIDRAZINA (PHZ- 10MG/KG) OU SALINA (NACL 0,9%). (C E D). OS ENSAIOS FORAM REALIZADOS POR CITOMETRIA DE FLUXO A PARTIR DE SANGUE TOTAL PREVIAMENTE INCUBADO COM ANTICORPO ANTI-CD16/32 PARA BLOQUEIO DE LIGAÇÕES INESPECIFICAS FCR. PARA IDENTIFICAÇÃO DE NEUTRÓFILOS FOI UTILIZADO ANTICORPOS ANTI-LY6G-APC E ANTI-CD11B-PE (C); OU ANTI-LY6C-APC E ANTI-CD43-PE PARA IDENTIFICAÇÃO DE MONÓCITOS (D); E FAM-YVAD-FLICA-FITC PARA IDENTIFICAÇÃO DE CASPASE-1 ATIVA. OS RESULTADOS ESTÃO EXPRESSOS COMO MÉDIAS ± SEM E FORAM DETERMINADOS POR TEST T DE STUDENT. \* P<0,05; \*\* P<0,01 comparado grupo Salina. Esses dados mostram que, embora a administração única de PHZ tenha GERADO UMA ATIVIDADE DE CASPASE-1 MAIS PRONUNCIADA EM MONÓCITOS DOS CAMUNDONGOS C57BL6, EM COMPARAÇÃO COM A HEM CRÔNICA, A DOSE ÚNICA DE PHZ NÃO RESULTOU NO AUMENTO DA LIBERAÇÃO DE IL-18 E IL-18 NOS ANIMAIS, AO FIGURA 44. AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE MOLÉCULAS DE ADESÃO EM CÉLULAS ENDOTELIAIS DE CORDÃO UMBILICAL HUMANO (HUVECs) estimuladas com heme. As células ( $2x10^5$ ) foram cultivadas em meio F12K suplementado com 0.1%de soro fetal bovino (SFB) por 3 horas na presença de heme  $(25 - 100 \,\mu\text{M})$  ou na ausência dos estímulos (Basal) A 37°C, EM 5% DE CO2. A PORCENTAGEM DE HUVECS QUE EXPRESSAM ICAM-1, VCAM-1, E-SELECTINA E FLICA FORAM AVALIADAS POR CITOMETRIA DE FLUXO. OS RESULTADOS ESTÃO EXPRESSOS COMO MÉDIAS ± SEM PARA CULTURAS EM DUPLICATAS OU TRIPLICATAS E SÃO REPRESENTATIVOS DE 4 EXPERIMENTOS INDEPENDENTES. VALOR DE P DETERMINADO POR FIGURA 45. EFEITOS DA S100A8 NA ATIVAÇÃO DE CÉLULAS ENDOTELIAIS DE CORDÃO UMBILICAL HUMANO (HUVECS) INDUZIDA POR HEME. AS HUVECS (2x10<sup>5</sup> células) foram incubadas na ausência dos estímulos (Basal) ou na presença de heme  $(50\mu M)$  por 3 horas, ou pré-estimuladas com S100A8  $(1\mu g/mL)$  por 3 horas antes da incubação com heme, em MEIO F12K SUPLEMENTADO COM SFB 0.1%, A 37ºC, EM 5% DE CO₂. A PORCENTAGEM DE HUVECS QUE EXPRESSAM ICAM-1, VCAM-1, E-SELECTINA E FLICA FORAM AVALIADAS POR CITOMETRIA DE FLUXO. OS RESULTADOS ESTÃO EXPRESSOS COMO MÉDIAS ± SEM PARA CULTURAS DUPLICATAS OU TRIPLICATAS E SÃO REPRESENTATIVOS DE 4-6 EXPERIMENTOS INDEPENDENTES. Valor de P determinado por teste Šídák (A-C) ou de Holm-Šídák (D). .....139 FIGURA 46. EFEITOS DA INCUBAÇÃO DE CÉLULAS ENDOTELIAIS DE CORDÃO UMBILICAL HUMANO (HUVECS) COM INIBIDOR DE CASPASE-1 NA INDUÇÃO DE MOLÉCULAS DE ADESÃO ENDOTELIAL ESTIMULADAS POR HEME. AS HUVECS (2x10<sup>5</sup> CÉLULAS) FORAM PREVIAMENTE TRATADAS POR 1 HORA COM INIBIDOR DA ATIVIDADE DE CASPASE-1 YVAD-CMK (10  $\mu$ M; colunas PREENCHIDAS EM PONTOS - YVAD) OU COM VEÍCULO DMSO (0.01% EM PBS ESTÉRIL, COLUNAS VAZIAS). APÓS AS CÉLULAS foram incubadas na ausência dos estímulos (Basal) ou na presença de heme ( $50\mu M$ ) por 3 horas em meio F12K SUPLEMENTADO COM SFB 0.1%, A 37ºC, EM 5% DE CO₂. A PORCENTAGEM DE HUVECS QUE EXPRESSAM ICAM-1, VCAM-1, E-selectina e FLICA foram avaliadas por citometria de fluxo. Os resultados estão expressos como médias ± SEM PARA CULTURAS DUPLICATAS E SÃO REPRESENTATIVOS DE 4 EXPERIMENTOS INDEPENDENTES. VALOR DE P DETERMINADO POR TESTE TUKEY (A E D) OU DE HOLM-ŠÍDÁK (B-C)......140

FIGURA 47. EFEITOS DA INCUBAÇÃO DE CÉLULAS ENDOTELIAIS DE CORDÃO UMBILICAL HUMANO (HUVECS) COM INIBIDOR DE CASPASE-1 NA INDUÇÃO DE MOLÉCULAS DE ADESÃO ENDOTELIAL ESTIMULADAS POR HEME E S100A8. AS HUVECS (2x10<sup>5</sup> CÉLULAS) FORAM PREVIAMENTE TRATADAS POR 1 HORA COM INIBIDOR DA ATIVIDADE DE CASPASE-1 YVAD-CMK (10 μM; COLUNAS PREENCHIDAS EM PONTOS - YVAD) OU COM VEÍCULO DMSO (0.01% EM PBS ESTÉRIL, COLUNAS VAZIAS). APÓS AS CÉLULAS FORAM INCUBADAS NA AUSÊNCIA DOS ESTÍMULOS (BASAL) OU NA PRESENÇA DE HEME (50μM) POR 3 HORAS, OU PRÉESTIMULADAS COM S100A8 (1μG/ML) POR 3 HORAS ANTES DA INCUBAÇÃO COM HEME, EM MEIO F12K SUPLEMENTADO COM SFB 0.1%, A 37°C, EM 5% DE CO2. A PORCENTAGEM DE HUVECS QUE EXPRESSAM ICAM-1, VCAM-1, E-SELECTINA E FLICA FORAM AVALIADAS POR CITOMETRIA DE FLUXO. OS RESULTADOS ESTÃO EXPRESSOS COMO MÉDIAS ± SEM PARA CULTURAS DUPLICATAS E SÃO REPRESENTATIVOS DE 4 EXPERIMENTOS INDEPENDENTES. VALOR DE P DETERMINADO POR TESTE HOLM-ŠÍDÁK (A E D) OU ŠÍDÁK (B-C).

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1. RELAÇÃO DE ANTICORPOS UTILIZADOS NA TÉCNICA DE WESTERN BLOT, PARA DETECÇÃO DE EXPRESSÃO PROTEICA DE	NLPR3,
IL-1B, CASPASE-1 E GAPDH	42
TABELA 2. RELAÇÃO DE ANTICORPOS UTILIZADOS PARA IMUNOFENOTIPAGEM DE NEUTRÓFILOS, MONÓCITOS E CÉLULAS DE KUF	PFFER DE
MURINO, E CÉLULAS ENDOTELIAIS (HUVEC)	127
TABELA 3. RELAÇÃO DA SEQUÊNCIA DOS INICIADORES UTILIZADOS PARA A RT-PCR	131
Tabela 4. Perfil hematológico dos camundongos controle salina e de camundongos submetidos à hemólise	
INTRAVASCULAR AGUDA.	132

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIM2: Absent in melanoma-2 (AIM2)-like receptors, Absent in melanoma-2 (AIM2)-like receptors ASC: Apoptosis-associated speck-like protein containing a caspase recruitment domain ATP: Adenosina trifosfato BIR: Baculovirus inhibitor repeat CARD: Caspase recruitment domain COX2: Ciclooxigenase-2 DAMPs: Damage Associated Molecular Patterns GSDM-D: Gasdermina D Hb: Hemoglobina Hp: Haptoglobina HUVECs: Células Humana de Veia de Cordão Umbilical Hx: Hempexina ICAM: Molécula de adesão intercelular IFN-γ: Interferon gama IL: Interleucina IL-1R: Receptor de interleucina 1 KC: Células de Kupffer LPS: Lipopolissacarídeo LRR: Leucine-rich repeat MCP1: Proteína quimiotática de monócitos 1 MRPs: Myeloid-related protein NETs: Neutrophil extracellular traps NF-KB: Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of Activated B cells NLRs: Nucleotide-binding oligomerization domain-like Receptors NO: Óxido Nítrico

NOD: Nucleotide-binding oligomerization domain-like receptors NOS: Óxido nítrico sintase NPCs: Células não-parenquimais NSPs: Neutrophil Serine Proteases PAMPs: Pathogen Associated Molecular Patterns PHZ: Fenilhidrazina PRRs: Receptores Reconhecedores de Padrão RLR: RIG-I like repceptor SIRT1: Sirtuína 1 TLRs: Toll Like Receptors TNF-α: Fator de Necrose Tumoral Alfa VCAM: Molécula de adesão vascular

1	INTR	ODUÇÃO	25
	1.1	DOENCAS HEMOLÍTICAS	25
	1.2	PROCESSO HEMOLÍTICO	25
	1.2.1	Hemólise intravascular e inflamação estéril	25
	1.3	RECEPTORES DA IMUNIDADE INATA E INFLAMASSOMAS	28
	1.4	SINALIZAÇÃO E PAPEL DAS IL-1B E IL-18 NA INFLAMAÇÃO	30
	1.5	Proteína S100A8 e ativação de inflamassomas	31
2	JUST	IFICATIVA	32
3	OBJE	TIVOS	33
	31	GERAL	33
	3.2		
	0. <u>_</u>		
4	IVIEI		34
	4.1	Aspectos Éticos da Pesquisa	34
	4.1.1	Animais	34
	4.1.2	Linhagem celular	34
	4.2	INDUÇÃO DA HEMÓLISE INTRAVASCULAR AGUDA E CRÔNICA	34
	4.3	TRATAMENTOS FARMACOLÓGICOS DOS ANIMAIS	35
	4.4	FLUXOMETRIA POR LASER DOPPLER	35
	4.5	MICROSCOPIA INTRAVITAL	36
	4.6	COLETA E PROCESSAMENTO DE AMOSTRAS DE CAMUNDONGOS	36
	4.6.1	Isolamento de células de Kupffer de camundongos	37
	4.7	CULTURA DE CELULAS ENDOTELIAIS DE CORDAO UMBILICAL HUMANO – HUVEC	37
	4.8	IRATAMENTOS IN VITRO DE HUVECS	38
	4.9	CITOMETRIA DE FLUXO	38
	4.9.1	Avallação de caspase-1 alivada	38 20
	4.9.2	Aquisição de eventos e analises	39
	4.10	EXTRAÇÃO DE RINA E SINTESE DE CUINA DE HOVEC	40
	4.11		41 //1
	4.12		41 17
	4.15		42 12
	4.14 11	1 Quantificação de hemoalohina e heme	43 12
	4.14 A 1A	<ol> <li>Quantificação de herrogiobina e neme inclusiona e n NEME e neme inclusiona e neme inclusi</li></ol>	رہے 12
	4.15	Análise estatística	43
5	RESU	JLTADOS	45
	51		15
	5.2	AVALIAÇÃO DA LIBERAÇÃO DE CITOCINAS PRÓ-INELAMATÓRIAS DE CAMUNDONIGOS SUBMETIDOS AO PROCESSO	+J
			50
	53	Αναμασᾶο /Ν ///Ο DOS FEFITOS DO PROCESSO INFLAMATÓRIO INDUZIDO PELA HEMÓLISE INTRAVASCULAR AGUDA Ν	
	MICROCI	RCULAÇÃO DE CAMUNDONGOS C57BL6	
	5.4	INVESTIGAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO DE INFLAMASSOMA NA RESPOSTA INFLAMATÓRIA INDUZIDA PELA HEMÓI ISF	
	INTRAVA	SCULAR AGUDA	54
	5.4.1	Investigação dos efeitos da hemólise intravascular aquda na ativação de caspase-1 em neutro	ófilos
	e ma	nócitos de camundongos	55
	5.4.2	Avaliação da participação do inflamassoma NLRP3 nos processos de inflamação vascular	
	indu	zidos pela hemólise aguda	60

# SUMÁRIO

5.	.5	Avaliação da participação de Caspase-1 no processo inflamatório induzido pela hemólise intravascular			
AC	GUDA	66			
5.	.6	CARACTERIZAÇÃO <i>IN VIVO</i> DO MODELO DE HEMÓLISE CRÔNICA73			
5.	.7	Efeitos da hemólise intravascular crônica na atividade de caspase-1 em leucócitos de camundongos75			
5.	.8	Avaliação da formação de inflamassoma em tecido hepático após indução da hemólise intravascular			
CF	crônica 81				
5.	.9	Avaliação da participação das células endoteliais na resposta inflamatória induzida por moléculas			
DE	DERIVADAS DO PROCESSO HEMOLÍTICO				
	5.9.1	Avaliação do efeito do heme na ativação de células endoteliais de cordão umbilical humano83			
	5.9.2	2 Investigação do efeito do heme na liberação de moléculas inflamatórias de células endoteliais86			
	5.9.3	Avaliação da indução da atividade de caspase-1 e liberação de IL-16 em células endoteliais			
	estimuladas com heme				
	5.9.4	Avaliação do efeito do heme na indução da ativação de inflamassoma em células endoteliais89			
	5.9.5	Avaliação dos efeitos de S100A8 na ativação de células endoteliais induzida por heme91			
	5.9.6	6 Efeito de S100A8 no processamento de IL-1β por células endoteliais95			
	5.9.7	<sup>7</sup> Efeitos da alarmina S100A8 no priming de células endoteliais para a formação de inflamassoma97			
6	DISC	USSÃO99			
7	CON	CLUSÕES			
8	REFE	RÊNCIAS			
9	APÊ	NDICES			
10	ANE	XOS			

#### 1 INTRODUÇÃO

#### 1.1 Doenças hemolíticas

As desordens hemolíticas se caracterizam pela destruição acelerada das hemácias em uma taxa elevada, resultando na redução da sobrevida dessas células sanguíneas. As síndromes hemolíticas podem manifestar-se de maneira aguda ou crônica, podendo ou não resultar em anemia hemolítica. Esta última é assim definida por caracterizar-se pela diminuição da sobrevida e do número de hemácias circulantes, mesmo quando em compensação a esta redução, há um aumento na produção de eritrócitos pela medula óssea (1-3). As doenças hemolíticas podem decorrer de diferentes origens e patologias, podendo ser intrínsecas às hemácias e hereditárias como a anemia falciforme,  $\beta$ -talassemia, esferocitose e deficiência de G6PD, ou adquiridas como a hemoglobinúria paroxística noturna e cirrose hepática (4, 5). Além disso, também podem estar associadas a fatores extrínsecos às hemácias como as de origem imunológica (Lupus eritromatoso, ou por drogas), mecânica (trombocitopenia purpura trombótica e disfunção prostática da válvula cardíaca), de origem infecciosa como na malária e a causada pelo *Clostridium perfringens*; e ainda por reações transfusionais, síndrome HELLP, aterosclerose e queimaduras (6-14).

#### 1.2 Processo hemolítico

O processo hemolítico, reconhecido pela destruição das hemácias (hemólise), pode ocorrer tanto no compartimento extravascular, no interior de macrófagos presentes no figado e baço, quanto no compartimento intravascular. Assim, a liberação imediata de componentes eritrocitários nos vasos sanguíneos, devido a hemólise intravascular, desencadeia uma condição fisiopatológica que afeta vários sistemas e órgãos essenciais e tem sido destacada como um mecanismo importante nas doenças hemolíticas que, além de sintomas específicos à etiologia, compartilham uma série de sequelas relacionadas ao quadro hemolítico como hipertensão pulmonar, úlceras cutâneas nas pernas e priapismo (4, 15-21).

#### 1.2.1 Hemólise intravascular e inflamação estéril

Na hemólise intravascular, a destruição das hemácias leva a liberação de hemoglobina (Hb), heme e ferro no plasma que, quando não estão compartimentalizadas dentro da hemácia, são consideradas moléculas altamente citotóxicas, pró-oxidantes e próinflamatórias (22, 23). A hemoglobina é uma proteína quaternária constituída de quatro cadeias polipeptídicas de globina ( $\alpha_2/\beta_2$  - HbA), onde cada uma possui em seu centro uma molécula de heme, um grupo protoporfirina IX ligado a um átomo de Ferro II (Fe<sup>2+</sup>) (24, 25). Mecanismos eficientes de proteção imediata, como os proporcionados pelas proteínas neutralizantes (scavengers) haptoglogina, hemopexina e ferritina, eliminam os produtos da hemólise (Hb, heme e ferro, respectivamente), transportando essas moléculas para as células do sistema mononuclear fagocítico e assim, neutralizam os seus efeitos prejudiciais (26, 27). No entanto, a destruição intravascular exacerbada dos eritrócitos, como ocorre na anemia falciforme (AF), leva à saturação do sistema protetor, com consequente acúmulo de Hb e heme livres e diminuição acentuada dos níveis plasmáticos de haptoglobina e hemopexina (28). Importante destacar que recentemente mostrou-se que a HbS livre, uma variante genética da Hb presente em pacientes com AF, desencadeia acentuada ativação pró-inflamatória em relação a HbA, um fenômeno associado a hemólise intravascular que pode potencializar os processos de vasooclusão (29). Além disso, um dos efeitos imediatos da hemólise intravascular e de Hb livre é o consumo de óxido nítrico (NO) no vaso sanguíneo (30, 31). A reação de Hb livre com o NO contribui na ativação endotelial e inflamação vascular, diminuição da biodisponibilidade de NO, além de levar à produção de nitrito e de espécies oxidadas de Hb, como as hemoglobinas férrica (HbFe<sup>3+</sup>) e ferrosa (HbFe<sup>2+</sup>) que liberam facilmente a molécula de heme na circulação (22, 32).

Quando a hemopexina (Hx) se encontra saturada, o heme livre se liga fracamente a outras proteínas, incluindo a albumina, α1-microglobulina, proteínas de coagulação e lipoproteínas. Por ter características lipofílicas, o heme penetra facilmente pelas membranas biológicas e conduz à oxidação dos ácidos graxos insaturados, resultando na produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e consequentemente à inflamação e danos celulares e tecidual (33, 34). O produto final tóxico mais identificável da liberação de heme é a lipoproteína de baixa densidade oxidada, que está associada às atividades inflamatórias e citotóxicas inerentes à capacidade da Hb em induzir lesão vascular (14, 35, 36). Os efeitos imediatos da hemólise intravascular que resultam na disfunção endotelial são ilustrados na Figura 1.



Figura 1. Contribuição da hemólise intravascular para a disfunção endotelial. A hemólise intravascular gera hemoglobina (Hb) livre, desencadeando reações de oxidação e o consumo de óxido nítrico (NO). Além disso, a hemólise intravascular libera arginase dos eritrócitos, esgotando a L-arginina no plasma, substrato essencial para a produção de NO pela óxido nítrico sintase endotelial (eNOS). Esse processo reduz a biodisponibilidade de NO, resultando em vasoconstrição, ativação de células endoteliais e agregação plaquetária. A Hb oxidada libera heme livre, que induz a expressão de moléculas de adesão nas células endoteliais (P-selectina, E-selectina, VCAM-1, ICAM-1), as quais interagem com leucócitos e plaquetas ativados. Assim, a hemólise intravascular, ao liberar Hb e heme livre, promove estresse oxidativo e inflamação, contribuindo para a disfunção vascular. Figura da autora. Criada com BioRender.com.

Evidências crescentes demonstram que o heme atua como uma molécula próinflamatória que se liga e ativa receptores da imunidade inata, como o *toll like* 4 (TLR4), induzindo assim, a ativação de células endoteliais e a produção de citocinas inflamatórias, como a interleucina-8 (IL-8) em neutrófilos e o fator de necrose tumoral alpfa  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) em macrófagos, e está associado a produção de IL-1 $\beta$  madura em macrófagos pré-sensibilizados com LPS (lipopolissacarídeo), sugerindo a formação de inflamassomas (37-40). Estudos demostraram que esta molécula induz a expressão de moléculas de adesão intercelular (ICAM-1) e vascular (VCAM-1), E-selectina e P-selectina nas células endoteliais, levando a sua ativação. Além disso, o heme também promove a quimiotáxia de neutrófilos que se aderem ao endotélio ativado e migram para o parênquima dos tecidos (37, 40-42).

#### 1.3 Receptores da imunidade inata e inflamassomas

Os receptores reconhecedores de padrão (PRRs), um dos principais componentes do sistema imune inato, estão presentes em diversos compartimentos celulares e são responsáveis pelo reconhecimento de PAMPs (pathogen associated molecular patterns - por exemplo o LPS) e DAMPs (damage associated molecular patterns – como a molécula heme), estimulando a fagocitose e induzindo a inflamação (43-45). Dentre os PRRs mais bem descritos estão os receptores toll like (TLRs) que estão presentes em leucócitos, células endoteliais, miócitos cardíacos e células epiteliais intestinais (46-48). A Ativação de TLRs induz a produção e secreção de diversas citocinas pró-inflamatórias, como o TNF- $\alpha$  e pró-IL-1 $\beta$  e moléculas coestimulatórias, através da ativação de fatores de transcrição, como o NF-KB (Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells) (47-49). Diferentemente dos TLRs, uma segunda classe de PRRs são os receptores do tipo NLRs (nucleotide-binding oligomerization domain-like receptors), que são proteínas citoplasmáticas presente em linfócitos, células fagocíticas e células endoteliais (50, 51). Os NLRs são estruturalmente caracterizados por três domínios, sendo um C-terminal LRR (Leucine-rich repeat; rico em repetições de leucina), um domínio intermediário NOD (nucleotide-binding oligomerization domain-like receptors) ou NACHT para ligação ao nucleotídeo de oligomerização, e um domínio N-terminal (pyrin domain PYD, caspase recruitment domain CARD, ou baculovirus inhibitor repeat BIR) que permite a interação com o domínio homólogo de uma proteína adaptadora (52-54).

Os NRLs, assim como PRRs intracelulares *RIG-1-like* (RLR) e receptor tipo AIM2 (*absent in melanoma-2 (AIM2)-like receptors*; ALR), atuam como sensores de DAMPs e PAMPs que levam à sua oligomerização, desencadeando a formação de inflamassomas (54-57). O inflamassoma é um complexo intracelular multiproteico e multimérico, formado a partir de um estímulo inflamatório, os quais são importantes para o processamento de IL-1 $\beta$  e IL-18, por um mecanismo dependente de caspases (58). Diversos tipos de inflamassomas já foram descritos, sendo os da família NLRs os mais estudados (NLRP1, NLRP3, NLRC4, NLRP6, e NLRP12) (59). A maior parte dos inflamassomas NLRs compartilham um domínio da família *pyrin*, uma proteína adaptadora denominada ASC (do inglês: *apoptosis-associated speck-like protein containing a caspase recruitment domain*, codificada pelo gene *PYCARD*) e caspase-1 como domínio efetor.

A ativação dos inflamassomas envolve sinais e mecanismos específicos para a montagem dos diferentes NLR, RLR e ALR. Devido a variação na expressão de padrões,

estrutura molecular e estímulo que levam a ativação de diferentes inflamassomas, dar-se-á como exemplo o NLRP3 (Figura 2) que é atualmente o mais caracterizado e estudado (60, 61). A ativação desse inflamassoma ocorre através de um sinal 1 (*priming*) pelo reconhecimento de moléculas imunogênicas por receptores transmembrana (TLRs, IL-1R e TNFR) que ativam vias de sinalização do NF $\kappa$ B resultando na síntese de pró-IL-1 $\beta$  e pró-IL-18, NLRs, ASC e pró-caspase-1 (62, 63). Essas proteínas constituintes do inflamassoma permanecem em um estado de autoinibição na ausência de estímulos secundários (sinal 2), que quando presente ativa o sensor NLR que se oligomeriza e recruta ASC, formando interações homotípicas entre seus domínios PYD. Em seguida, a pro-caspase-1 é recrutada à ASC através dos domínios CARD, formando o complexo multiproteico e multimérico, resultando na ativação de caspase-1 (52, 56, 59, 64, 65) e em piroptose, um tipo de morte celular (66).



Figura 2. Formação do inflamassoma NLRP3 e ativação de caspase-1. As células imunes, incluindo macrófagos e neutrófilos, passam por um processo de estimulação (sinal 1 ou *priming*) mediante a ação de agonistas dos receptores transmembrana TLR, como o LPS e a alarmina S100A8. Isso resulta na fosforilação do fator de transcrição nuclear NF-κB, que migra para o núcleo celular, desencadeando a síntese de pró-IL-1β, pró-IL-18 e dos componentes do inflamassoma (NLR, ASC e pró-caspase-1). Um segundo sinal (sinal 2 – heme, ROS, ATP, HMGB1, cristais de MSU e toxinas) ativa o sensor NLR, levando a sua oligomerização e ao recrutamento da proteína adaptadora ASC. Esta, por sua vez, recruta a pró-caspase-1, formando o complexo inflamassoma e resultando na ativação da caspase-1. A caspase-

1 realiza a clivagem das formas precursoras de IL-1 $\beta$  e IL-18, convertendo-as em suas formas biologicamente ativas. Adicionalmente, a caspase-1 induz a clivagem de gasdermina-D, formando poros na membrana plasmática celular (piroptose), permitindo a liberação de IL-1 $\beta$  e IL-18, bem como a liberação de outros DAMPS, como ATP, DNA mitocondrial (DNAm) e ROS. Figura da autora. Criada com BioRender.com.

As caspases são proteases que possuem em seus sítios ativos resíduos de cisteína, os quais clivam proteínas com cadeia final em aspartatos. Apesar de sua função amplamente conhecida na clivagem das formas precursoras de IL-1 $\beta$  e IL-18 na suas formas ativas e na liberação de IL1- $\alpha$  para amplificação dos efeitos mediada por IL-1 $\beta$  (67-69), há evidencias crescentes de que a caspase-1 regule múltiplas funções celulares durante o estresse celular (70, 71). Por exemplo, sabe-se que a caspase-1 participa no aumento da sensibilidade tecidual periférica à insulina através da clivagem de SIRT1; estimula a exposição de actina em micropartículas plaquetárias e a autofagia mitocondrial; e atua na clivagem de enzimas glicolíticas, o que leva a redução da taxa glicólica intracelular e morte celular (70, 72-74).

A piroptose é um mecanismo de morte celular desencadeado pela a ativação de caspases inflamatórias (-1, -4, -5, -11, e -12), e clivagem de proteínas formadoras de poros, as gasderminas (GSDM). A clivagem da GSDM-D pela caspase-1 leva ao intumescimento e ruptura celular resultando na liberação de IL-1 $\beta$  e pró-caspase-1 extracelular. Assim a morte celular induzida por caspase-1 contribui na liberação dos componentes e citocinas intracelulares, como a IL-1 $\beta$ , IL- $\alpha$  e IL-18, que atuam em leucócitos e células não imunes, perpetuando uma cascata de inflamação (75-78).

#### 1.4 Sinalização e papel das IL-1β e IL-18 na inflamação

As IL-1 $\beta$ , IL-1 $\alpha$  e IL-18 são membros de uma família de citocinas pró-inflamatórias (IL-1), sendo as suas principais fontes os macrófagos, monócitos, células epiteliais e endoteliais (79, 80). Enquanto as IL-1 $\beta$  e IL-1 $\alpha$  compartilham do mesmo receptor (IL-1R) para exercerem funções biológicas, a IL-18 possui seu próprio receptor de superfície celular, um heterodímero constituído de cadeias  $\alpha$  (IL-18R $\alpha$ ) o qual após ser ativado por IL-18 recruta a subunidade IL-18R $\beta$ , formando um complexo que inicia a via de sinalização intracelular (81, 82). Os

mecanismos intracelulares de sinalização após a ativação do IL-1R e do complexo IL-18R envolvem o recrutamento de um número de moléculas adaptadoras intracelulares, como a molécula adaptadora do fator de diferenciação mielóide 88 (MYD88), proteína quinase associada ao receptor de interleucina-1 (IRAK) e de fator associado a receptor de TNF 6 (TRAF6). O recrutamento destas moléculas promove a ativação de fatores e sinais de transdução como NF- $\kappa$ B e proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPKs: ERKs e JNKs). Uma vez ativos, estes fatores induzem a expressão de genes alvo codificadores de IL-6, IL-8, proteína quimiotática de monócitos 1 (MCP1), ciclooxigenase-2 (COX2) e as proteínas do inflamassoma (NLR, ASC e pró-caspase-1). Paralelamente a isso, as IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-18 também induzem a expressão de seus próprios genes, o que serve como um ciclo de retroalimentação positiva que amplifica a resposta da IL-1 de maneira autócrina ou parácrina (83-85).

Os efeitos da ativação de IL-1R e IL-18R e produção de várias quimiocinas e citocinas levam ao recrutamento e adesão de leucócitos ao endotélio por induzir a expressão de moléculas de adesão celular, e a produção de fosfolipase A, COX2 e atividade de óxido nítrico sintase (NOS), contribuindo para as respostas locais e sistêmicas (86, 87). Além disso, essas citocinas também estimulam a resposta imune adaptativa e humoral através da ativação de linfócitos T-helper 1 (Th1) e Th17, já que a IL-1 $\beta$  induz a liberação de IL-6 e IL-17, enquanto que a IL-18 induz a liberação de interferon gama (IFN- $\gamma$ ), IL-2 e IL-12 (88-90).

#### 1.5 Proteína S100A8 e ativação de inflamassomas

As proteínas da família S100, também denominadas MRPs (myeloid-related protein), são proteínas ligantes de Ca<sup>2+</sup> e estão localizadas no citoplasma de células mieloides (91). Diversas proteínas S100 já foram descritas como estimuladoras endógenas da resposta inflamatória, incluindo a S100A8 e S100A9 que após serem liberadas de monócitos e neutrófilos desempenham função ativadora de PPRs como TLR4 e RANGE (92-94). Simard e colaboradores (95) mostraram que S100A8/A9 leva à secreção de IL-1β, IL-6 e TNF- $\alpha$ , dentre outras quimiocinas, em um processo ligado à geração de ROS e dependente de NF- $\kappa$ B com formação de inflamassoma NLRP3. Em estudo recente nosso, foi demonstrado *in vivo* que os níveis plasmáticos de S100A8 foram elevados em camundongos submetidos à hemólise aguda, além disso, dados *in vitro* mostraram que esta proteína potencializa os efeitos do heme na produção de IL-1 $\beta$ , sugerindo que S100A8 também pode atuar como sinal 1 (*priming*) na ativação de inflamassoma e caspase-1 durante o processo hemolítico estéril (96, 97).

#### 2 JUSTIFICATIVA

Recentes descobertas *in vitro e in vivo* mostram que a hemólise desempenha um papel importante nos mecanismos de ativação endotelial, produção de ROS e a ativação e migração de leucócitos (22). A destruição das hemácias na circulação leva à liberação de vários componentes potencialmente inflamatórios, dentre eles a hemoglobina e o heme. Estudos tem demonstrado que o heme e diferentes formas oxidadas de hemoglobina induzem a formação do inflamassoma NLRP3 e a produção de IL-1 $\beta$  madura em macrófagos pré-sensibilizados com LPS, molécula frequentemente utilizada como agente de *priming* para estimular a produção de pró-IL1- $\beta$  *in vitro* e em modelos de hemólise aguda induzida por fenilhidrazina (38, 98).

Pesquisas do nosso laboratório, em modelos animal, demostraram que a hemólise aguda induzida por administração intravascular de água, e a hemólise crônica induzida com baixas doses de fenilhidrazina (PHZ) desencadeiam processos de inflamação vascular semelhante ao observado em camundongos com anemia falciforme (99, 100), mostrando que os modelos desenvolvidos mimetizam os efeitos inflamatórios estéreis que ocorrem nas doenças hemolíticas. Além disso, demostramos recentemente que este processo leva ao aumento de níveis circulantes de S100A8, uma proteína ligante de TLR4, a qual amplifica os efeitos do heme na produção de IL-1β, dependente da formação de NLRP3 em macrófagos humanos (39). Assim, esses dados evidenciam que o processo hemolítico induz a atividade inflamatória das células imune inata, porém não há elucidação dos efeitos *in vivo* da hemólise intravascular aguda e crônica e da proteína S100A8 no processo inflamatório estéril, bem como o envolvimento da ativação de caspases e formação de inflamasomas na inflamação e oclusão vascular que são desencadeados pela hemólise intravascular.

#### **3 OBJETIVOS**

#### 3.1 Geral

Investigar o papel da formação de inflamassoma e a ativação dos seus componentes nos processos de inflamação vascular que são desencadeados por processos hemolíticos.

#### 3.2 **Objetivos Específicos**

- Caracterizar *in vivo* os modelos de hemólise estéril intravascular aguda e crônica em camundongos C57BL6.
- Investigar o desencadeamento da formação do complexo inflamassoma e do processamento de IL-1β/IL-18 por processos de hemólise intravascular (agudo e crônico), *in vivo*.
- Investigar os órgãos e células participantes no processamento de IL-1β/IL-18 provocados por processos de hemólise intravascular (agudo e crônico), *in vivo* e *in vitro*.
- Investigar *in vivo* e *in vitro* os mecanismos envolvidos na formação do inflamassoma em resposta à hemólise (ex. o envolvimento dos DAMPs derivados de eritrócitos e das alarminas, como a S100A8).
- Determinar o papel da formação de inflamassoma, desencadeado por hemólise intravascular, em processos inflamatórios, como recrutamento de leucócitos na vasculatura e inflamação sistêmica.
- Investigar abordagens para limitar os efeitos dos processos inflamatórios desencadeados pela hemólise.

#### 4 MÉTODOS

#### 4.1 Aspectos Éticos da Pesquisa

#### 4.1.1 Animais

Os camundongos C57BL6/J, entre 4 a 5 meses de idade, utilizados nesse estudo foram obtidos do CEMIB Unicamp e mantidos no biotério do Laboratório de Biologia Molecular e Hemostasia, Hemocentro, Unicamp, e manipulados de acordo com a LEI N° 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais; DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009; e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA); tendo sido submetido ao Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas, sob o protocolo nº 5144-1/2019 e nº 5144(A)-1/2022.

Os animais foram acondicionados em gaiolas plásticas e mantidos no Biotério, com ciclos artificiais de 12 horas claro e escuro e temperatura controlada, servidos a vontade de água e ração.

#### 4.1.2 Linhagem celular

Células Humana de Veia de Cordão Umbilical (HUVECs) foram comercialmente adquiridas da *American Type Culture Collection* (ATCC<sup>®</sup> - Manassas, VA, EUA), mantidas em cultura ou criopreservadas em nitrogênio líquido, sob anuência do Comitê de Ética em Pesquisas envolvendo Seres Humanos (CEP) da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), sob ofício CEP nº 075/2022.

#### 4.2 Indução da hemólise intravascular aguda e crônica

Para a indução da hemólise intravascular aguda, os camundongos C57BL6/J foram anestesiados com isoflurano 3% e receberam um único estímulo hemolítico através da administração de 150 µL de água estéril, via plexo retro-orbital. Como controles, camundongos de mesma linhagem receberam solução salina (NaCl 0,9%) estéril (99).

Para a indução da hemólise crônica, os camundongos receberam por via intraperitoneal (i.p.) 10 mg/Kg de fenilhidrazina (PHZ, Sigma Aldrich), 3 vezes por semana, por 4 semanas, totalizando 28 administrações. De mesma maneira, os animais de grupo controle

sem hemólise receberam, via i.p., solução salina (NaCl 0,9%) estéril (100). Paralelamente, um terceiro grupo de animais foi obtido para fins de comparação com o grupo de hemólise crônica, sendo que os camundongos deste último grupo foram estimulados com uma única dose de PHZ (10 mg/Kg, i.p.). Os animais de todos os grupos foram eutanasiados após 48 horas da última, ou única administração de PHZ para a coleta de sangue total e órgão.

#### 4.3 Tratamentos farmacológicos dos animais

Previamente ao estímulo hemolítico intravascular agudo ou de salina, os camundongos foram tratados por 1 hora com o inibidor de inflamassoma NLRP3 MCC950 (50 mg/Kg, via i.p.), enquanto que os respectivos grupos controles foram tratados com PBS 1X estéril. Para a inibição seletiva de caspase-1, os camundongos foram tratados com YVAD-cmk (8 mg/Kg) ou veículo DMSO 0,5% (Dimetilsulfóxido) em PBS estéril para o grupo controle, ambos via intraperitoneal, 1 hora antes do estímulo hemolítico ou de salina. Em seguida, a hemólise intravascular foi induzida com uma administração retro-ocular de água estéril (grupo Hemólise) ou de solução de NaCl 0,9% estéril (grupo Salina).

#### 4.4 Fluxometria por Laser Doppler

Para investigar os efeitos inflamatórios da hemólise aguda sobre o fluxo sanguíneo microcirculatório foi utilizado um sistema de fluxometria a laser. Esta técnica não invasiva é baseada no efeito Doppler de um feixe de raios refletidos por células sanguíneas e permite uma avaliação quantitativa da concentração e velocidade das células sanguíneas e perfusão microcirculatória de uma região delimitada, com profundidade de medição típica da ordem de 0,3 a 0,5 milímetros.

Os camundongos foram anestesiados com solução de cetamina 80 mg/Kg e xilasina 10 mg/Kg (via intraperitoneal) e rapidamente submetidos a tricotomia da região pélvica para fixação à pele da sonda de diâmetro Ø 1.0 mm e laser 780 nm (Probe 407, PERIMED<sup>®</sup>). Anteriormente aos estímulos de hemólise intravascular aguda ou salina, foram realizadas as aferições dos parâmetros de cada animal (condição Basal), e posteriormente, após 15 minutos ou 1 hora da administração intravenosa de água ou salina estéril. Cada mensuração foi realizada dentro de 10 minutos e o cálculo da média das unidades arbitrárias de concentração de células (CMBC), Velocidade das células e Perfusão da microcirculação foram realizadas pelo equipamento PeriFlux 6000 (PERIMED<sup>©</sup>). Os valores absolutos foram normalizados pela média arbitrária de cada animal na condição Basal.

#### 4.5 Microscopia intravital

Os camundongos foram anestesiados com (cetamina 80 mg/Kg e xilasina 10 mg/Kg, i.p.) e em seguida a região peritoneal e pélvica dos camundongos foram tricotomizadas e higienizadas com lenço umedecido com etanol a 70%. Em seguida, um corte cirúrgico em um dos lados da bolsa escrotal foi realizado para a exposição do testículo e exteriorização do cremaster (músculo que recobre os funículos espermáticos e os testículos). Após a preparação cirúrgica do cremaster, os animais foram levados ao microscópio intravital (Zeiss Imager M.2), para visualização da microvasculatura. Foram adquiridas imagens de 5 a 10 vênulas, variando entre 25 e 35 µm de diâmetro, por animal, tendo o diâmetro sido medido através de uma ferramenta do software (AxioVision, Zeiss). Em seguida as imagens do fluxo sanguíneo de cada vênula (40 frames por segundo) foram adquiridas na objetiva de 63X utilizando luz de campo claro, por um período máximo de 20 minutos. Após as aquisições, as imagens foram exportadas em formatos de vídeos de 1 minuto cada para análise quantitativa de leucócitos em rolamento e aderidos ao endotélio, e extravasados.

#### 4.6 Coleta e processamento de amostras de camundongos

Decorrido o período de indução da hemólise intravascular, os animais foram anestesiados (cetamina 80 mg/Kg e xilasina 10 mg/Kg, i.p.) para a coleta de sangue total, por punção cardíaca ou retro-ocular e coleta dos tecidos.

Para obtenção do plasma as amostras de sangue total coletadas em anticoagulante EDTA 200mM através da punção cardíaca foram centrifugadas a 2500 x g a 4 °C por 15 minutos e transferidos em microtubos, aliquotados e armazenados a -80 °C para ensaios posteriores. Para análise de citometria, aproximadamente 110  $\mu$ L de sangue total foi coletado através do plexo retro-ocular com auxílio de capilares heparinizados e transferidos para microtubos contendo heparina. Subsequentemente, os animais foram eutanasiados sob aprofundamento de anestesia para dar início a dissecação de rim, figado e baço. Os órgãos foram mantidos em solução de PBS (pH 7,4) para remoção dos tecidos adjacentes e seccionamento e processamento. Espécimes de figado foram perfundidos com PBS e
armazenados a -80 °C para avaliação da expressão de pró-caspase-1 e pró-IL-1β por imunoblot e quantificação de IL-β madura no tecido por ELISA.

#### 4.6.1 Isolamento de células de Kupffer de camundongos

Após a eutanásia, uma incisão abdominal foi realizada para dar acesso ao figado e veia cava do animal. Um scalp de 24G foi inserido na veia cava, abaixo da veia porta, e a mesma foi pinçada para impedir o retorno de fluídos. Em seguida, o fígado do animal foi perfundido através da infusão da solução de perfusão previamente aquecida a 37 °C (Liver Perfusion médium - Gibco<sup>TM</sup>). Após a perfusão o órgão foi dissecado gentilmente, separado em lobos e transferido para um tubo cônico contendo 20 mL de tampão de digestão contendo colagenase (Liver Digest Medium Gibco<sup>TM</sup>). O tecido foi então fragmentado em menores partes e incubado por 40 minutos a 37 °C para digestão enzimática, sob agitação esporádica. Após, os fragmentos do tecido foram macerados e filtrados contra um filtro de nylon (cell strainer) de 100 µm. Posteriormente, o homogenato foi lavado com PBS e centrifugado a 30 × g por 4 minutos a 25 °C para separação dos hepatócitos e debris, repetindo-se a lavagem por mais 2 vezes. Após a terceira centrifugação, o sobrenadante foi coletado e submetido a 2 centrifugações seguidas de 300 × g por 10 minutos a 22 °C para sedimentação das células não-parenquimais (NPCs) contendo leucócitos e células de Kupffer. Após, as NPCs foram cuidadosamente removidas e suspensas em PBS e novamente centrifugadas a 1500 × g por 20 minutos a 25°C e ressuspendidas com 1 mL meio RPMI estéril. A contagem de células viáveis foi realizada com corante azul de Trypan em câmara de Neubauer, tendo rendimento médio de 13x106 células/mL.

## 4.7 Cultura de Células Endoteliais de Cordão Umbilical Humano – HUVEC

As HUVECs foram cultivadas em meio de cultura modificado Ham's F-12 Kaighn's (F12K, Gibco<sup>TM</sup>) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB, Invitrogen), fator de crescimento endotelial (30 ng/mL, Calbiochem<sup>®</sup>), heparina sódica (10 U/mL, Cristália) e antibióticos estreptomicina (10000 µg/mL) e penicilina (10000 U/mL). As células foram cultivadas em garrafas de 75 cm<sup>2</sup> (T75) para células aderentes e mantidas em incubadora úmida a 37 °C com atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>, por aproximadamente 2 semanas ou até atingirem confluência  $\geq$  90%, com renovação do meio a cada 72 horas.

Para o subcultivo, as células foram desanexadas das garrafas de cultura com solução Tripsina 0,25% e EDTA 0,53 mM (Gibco<sup>TM</sup>) por 4 minutos a 37 °C, que posteriormente foi neutralizada com a adição de SFB em igual proporção. Em seguida, as células foram coletadas em tubo cônico de 50 mL e lavadas com PBS. Após centrifugação de 130 × g a 22°C por 7 minutos e descarte do sobrenadante, as HUVECs foram ressuspendidas em meio F12K completo e subcultivadas na proporção de 1:2 em frascos T75. Para os ensaios, as células foram suspensas em meio F12K completo suplementado com SFB 2%, sendo que a concentração e viabilidade foi determinada por corante azul de Trypan. Uma concentração de 2x10<sup>5</sup> células/mL foi semeada por poço de 9,6 cm<sup>2</sup> e as placas foram mantidas em incubadora úmida overnight (37 °C, com 5% de CO<sub>2</sub>).

### 4.8 Tratamentos in vitro de HUVECs

As HUVECs ( $2x10^5$  células/mL) foram estimuladas ou não com LPS (lipopolissacarídeo ultrapuro; 100 ng/mL; Sigma), ou proteína recombinante humana S100A8 (1 µg/ml; Prospec) por 3 horas, na presença ou ausência de heme (50 µM; Frontier Scientific) por mais 3 horas, ou com heme sozinho nas concentrações de 25 µM, 50 µM ou 100 µM por 3 horas. Para avaliação da participação caspase-1 e inflamassoma na ativação das células endoteliais, anteriormente aos estímulos, as HUVECS foram tratadas por 1 hora com o inibidor de caspase-1 YVAD-cmk (10 µM, Sigma-Aldrich).

A fim de excluir possível contaminação com LPS, o neutralizador de LPS, polimixina B (10  $\mu$ g/mL; InvivoGen) foi empregado em ensaios onde o LPS não foi utilizado. As incubações foram realizadas com meio de cultura F12K completo suplementado com SFB 2% ou 0,1%, a 37 °C com atmosfera de 5% CO<sub>2</sub>. O sobrenadante foi coletado e centrifugado a 800 × *g* por 10 minutos a 4 °C e armazenado a -80 °C para posteriores análises por ELISA. Já as células foram coletadas para a análise da expressão de moléculas de adesão por citometria de fluxo, ou para análise de expressão gênica por PCR em tempo real.

## 4.9 Citometria de Fluxo

### 4.9.1 Avaliação de Caspase-1 ativada

A ativação de caspase-1 em monócitos, neutrófilos, células de Kupffer de murinos, e células endoteliais foi determinada por citometria de fluxo, utilizando a sonda de marcação intracelular FAM-YVAD-FMK (FAM-FLICA<sup>®</sup> Caspase-1 – ImmunoChemistryTechnologies®, Bloomington, MN, EUA). Em todas as amostras, a sonda FAM-YVAD-FMK conjugada ao fluorocromo FITC (1:40) foi adicionada em conjunto com os anticorpos para cada tipo celular (Apêndice I), sendo as incubações realizadas a 37 °C por 30 minutos. A etapa de lavagem foi realizada com o tampão Apoptosis Wash Buffer (FAM-FLICA® Caspase-1 (YVAD) Assay Kit), seguida de centrifugação a 200 × g por 5 minutos a 22 °C. Após, as células foram ressuspendidas em 200 µL PBS contendo solução fixativa 1:10 (Fixative FAM-FLICA® Caspase-1 (YVAD) Assay Kit).

Para neutrófilos e monócitos de camundongos, foi utilizada amostra de 50 µL de sangue total, enquanto que para células de Kupffer, suspensão de células não-parenquimais do fígado (NPCs 1x10<sup>6</sup> células/mL). As amostras de sangue total e de NPCs foram pré-incubadas com solução de bloqueio (Mouse BD Fc Block<sup>™</sup> purified anti-mouse CD16/ CD32 – 1:50) por 15 minutos a temperatura ambiente, anteriormente à incubação dos anticorpos em associação com a sonda FAM-FLICA. Para as amostras de sangue total, decorrido o período de incubação, as hemácias foram submetidas à lise com o tampão Pharm Lyse Buffer (BD<sup>™</sup>) por 15 minutos a temperatura ambiente, protegido da luz. Imediatamente após o período de lise, as células foram lavadas e ressuspendidas para aquisição em citomêtro de fluxo.

Para a análise de caspase-1 ativada de HUVECs, em associação com a expressão de moléculas de adesão endoteliais,  $1 \times 10^5$  células, estimuladas ou não, foram fixadas com solução paraformaldeído 1% por 2,5 minutos a temperatura ambiente. Após lavagem com PBS, as HUVECs foram dissociadas com solução Tripsina 0,25% e EDTA 0,53mM, a 37 °C por 4 minutos, seguida da incubação com SFB. As células foram coletadas e lavadas com PBS sob centrifugação de 150 × g por 7 minutos a 22 °C. O pellet celular obtido foi ressuspendido com 100 µL de PBS e incubado com 100 µL de solução contendo os anticorpos e FLICA.

#### 4.9.2 Aquisição de eventos e análises

A aquisição dos eventos foi realizada no citômetro de fluxo (Becton Dickinson<sup>®</sup>) FACS Calibur (mínimo de 5x10<sup>4</sup> eventos para amostras de camundongos e 2x10<sup>4</sup> para HUVECs), e as análises foram feitas utilizando o software FlowJo v.10.5.3. Para a estratégia de *gate* foi utilizado o parâmetro SSC/FSC (side scatter/forward scatter) na identificação de células viáveis e população de interesse. Foram considerados neutrófilos as células Ly6G<sup>high</sup> CD11b<sup>+</sup>; monócitos as células Ly6C<sup>high</sup> CD43<sup>+</sup>; Kupffer F4/80<sup>+</sup> CD11b<sup>+</sup> CD206<sup>-/+</sup>; expressos em porcentagem. Para a avaliação da ativação de caspase-1 os resultados foram expressos através da porcentagem de células positivas expressando caspase-1 ativa (FLICA<sup>+</sup>). A estratégia de *gate* para as respectivas populações podem ser conferidas em Apêndice II, Apêndice III e Apêndice IV.

## 4.10 Extração de RNA e Síntese de cDNA de HUVEC

Após os estímulos e tratamentos, o sobrenadante foi removido e as HUVECs foram lavadas com 2 mL de PBS e processadas para o isolamento de RNA através do Kit RNeasy<sup>®</sup> Micro (Qiagen). Para a lise celular, foram adicionados 350  $\mu$ L de tampão de lise RLT (Qiagen) contendo 10% de  $\beta$ -mercaptoetanol. Os lisados foram transferidos para microtubos e homogeneizados com 350  $\mu$ L de etanol 75% e imediatamente transferidos para colunas de separação (RNeasy MinElute, Qiagen) para centrifugação a 8000 × *g* por 30 segundos. Em seguida, as colunas foram sucessivamente lavadas com 350  $\mu$ L tampão RW1, 350  $\mu$ L tampão RPE contendo 4 volumes de etanol 96% a 8000 × *g* por 30 segundos, e 500  $\mu$ L de etanol 80%, a 8000 × *g* por 2 minutos. Para eluição do RNA, 14  $\mu$ L de água livre de RNase foram adicionados diretamente na membrana das colunas, nas quais foram acoplados novos tubos para coleta e centrifugadas a 12000 × *g* durante 1 minuto. A concentração de RNA total de cada amostra foi quantificada por espectrofotometria (NanoDrop UV 2000C-Vis).

Antes da síntese de cDNA, as amostras foram submetidas a remoção de traços de DNA genômico. Para isso, um volume de amostra correspondendo a concentração de 1 µg de RNA foi tratado com Mix contendo 1 µL de 10X Reaction Buffer enriquecido com MgCl<sub>2</sub>, 1 µL de DNase, dH<sub>2</sub>O·DEPC q.s.p. 10 µL, e incubado em termociclador (Termociclador de 96 poços Veriti<sup>™</sup> HID, Applied Biosystems<sup>™</sup>) a 37 °C por 30 minutos. Posteriormente foi adicionado 1 µL de EDTA 50 mM e as amostras foram incubadas novamente a 65 °C por 10 minutos.

A síntese de cDNA das amostras de HUVECs foi realizada com o kit de transcrição reversa (RevertAid HMinus Fist Strand cDNA Synthesis, Thermo Scientific). Às amostras de RNA, foram adicionados RT Master Mix (1  $\mu$ L oligo(dT)<sub>18</sub>); 4  $\mu$ L 5X Buffer Reaction Buffer; 1  $\mu$ L RibobLock RNase inhibitor (10U/ $\mu$ L); 2  $\mu$ L 10mM dNTP Mix; 1  $\mu$ L de ReverAid Minus MuLV Reverse Transcriptase (200U/ $\mu$ L). A incubação da reação foi programada no termociclador, sendo a primeira etapa a 42 °C por 60 minutos e a segunda a 70 °C por 5 minutos. A concentração de cDNA foi quantificada por espectrofotometria, utilizando o NanoDrop.

### 4.11 Reação em Cadeia de Polimerase quantitativa (qPCR)

Para a qPCR, todas as amostras foram corridas, em duplicatas e na mesma placa, em volume de 12 µL contendo: 10 ng de cDNA, 6 µL SYBR Green Master Mix PCR (Applied Biosystems<sup>™</sup>) e iniciadores para os genes *CASP1, IL18, IL1B, NLRP3* e *PYCARD*. A relação de sequência dos primers pode ser consultada no Apêndice V. A reação foi realizada utilizando o instrumento e software 500 Fast Dx Real-Time PCR (Applied Biosystems<sup>™</sup>). Para confirmar a acuidade e reprodutibilidade da qPCR, a precisão intraensaio foi calculada de acordo com a equação E(-1 / slop) e a dissociação do protocolo foi feito no final de cada corrida para chegar amplificações não especificas. Os resultados estão expressos como unidades arbitrárias da expressão do gene e foram normalizadas de acordo com a expressão de beta-actina e GAPDH, calculados através do programa geNorm.

#### 4.12 Imunoblot

Para a obtenção do extrato proteico, fragmentos hepáticos foram homogeneizados em tampão de solubilização contendo Tris 100 mM (pH 7,6), Triton X-100 1%, NaCl 150 mM, PMSF 35 mg/ml, Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> 10 mM, NaF 100 mM, Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub> 10 mM, EDTA 4 mM e coquetel com inibidores de proteases. O homogeneizado obtido foi centrifugado 12000 rpm a 4 °C, 20 minutos, e o sobrenadante coletado e armazenado a -80 °C. A quantificação total de proteínas foi determinada pelo método colorimétrico de Bradford.

Após obtenção dos extratos proteicos, às amostras foi adicionado tampão de Laemmli (azul de bromofenol 0,1%; fosfato de sódio 1 M, pH 7,0; glicerol 50%; SDS 10%) contendo β-Mercaptoetanol 10%. Previamente à corrida, as amostras foram fervidas por 5 minutos a 100 °C em banho seco. Posteriormente, as amostras de tecido hepático foram aplicadas em gel de poliacrilamida de 4 a 20% (SDS-PAGE – Premade gel MiniProteam<sup>®</sup>, BioRad) para separação proteica por eletroforese. Após a corrida, as proteínas foram transferidas para membranas de nitrocelulose ou PVDF e incubadas *overnight* a 4 °C com solução de anticorpo primário. Decorrido o período de incubação, as membranas foram tratadas com anticorpo secundário conjugado IgG – HRP e reveladas utilizando kit de quimioluminescência (Pierce ECL Western Blotting Substrate – Thermo Scientific, USA). As imagens foram capturadas em fotodocumentador e os valores de intensidade óptica obtidos na leitura das bandas foram corrigidos pela intensidade óptica da leitura das bandas incubadas com o anticorpo anti-GAPDH, utilizando o software ImageJ. A lista de anticorpos utilizados, bem como a diluição empregada nos ensaios podem ser consultados na tabela abaixo.

Tabela 1. Relação de anticorpos utilizados na técnica de western blot para detecção de expressão proteica de NLPR3, IL-1β, caspase-1 e GAPDH.

Anticorpo primário		Anticorpo secundário	
Antígeno	Diluição	Antígeno	Diluição
Rat Monoclonal anti-human/mouse	1:10	Goat anti-rat IgG-HRP	1:10000
NLRP3			
Rabbit Policlonal anti-IL-1 beta antibody		Mouse Monoclonal anti-rabbit IgG-HRP	
Rabbit Policlonal Anti-Caspase-1			
antibody			
Mouse Monoclonal anti-GAPDH		Rabbit anti-mouse IgG-HRP	
antibody			

## 4.13 Ensaio de Imunoabsorção Enzimática (ELISA)

Os plasmas obtidos dos camundongos foram utilizados na técnica de imunoensaio enzimático para quantificação de IL-1 $\beta$  (mouse IL-1 $\beta$ /IL-1F2 ELISA Kit, R&D<sup>®</sup>), IL-18 (mouse IL-18 ELISA kit, MBL<sup>®</sup>), IL-6 (mouse IL-6, Abcam), TNF- $\alpha$  (Mouse TNF-alpha Quantikine ELISA Kit, R&D<sup>®</sup>), proteína S100A8 (DuoSet mouse S100A8, R&D<sup>®</sup>), haptoglobina e hemopexina (Abcam<sup>®</sup>) seguindo as instruções dos fabricantes. A quantificação de IL-1 $\beta$  hepática foi realizada utilizando o kit comercial mouse IL-1 beta SimpleStep ELISA kit (Abcam<sup>®</sup>) conforme orientações do kit.

A concentração de IL-1β no sobrenadante das culturas de HUVEC foi quantificada através de kit de ELISA de alta sensibilidade (human Quantikine HS ELISA kit, R&D), enquanto que para MCP-1, IL-6 e IL-8 foram utilizados kits de ELISA (human Quantikine ELISA kit R&D<sup>®</sup>), sendo os ensaios realizados de acordo com as instruções do fabricante.

### 4.14 Ensaios Colorimétricos

### 4.14.1 Quantificação de hemoglobina e heme

A concentração plasmática de hemoglobina livre em amostras de camundongos foi quantificada como descrito por Fairbanks e colaboradores (101). Brevemente, o plasma obtido após os estímulos hemolíticos agudos foi diluído 1:11 em solução de carbonato de sódio (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0,942 M) e a absorbância mensurada em triplicata por espectrofotometria nos comprimentos de onda ( $\lambda$ ) 415 nm, 450 nm (coeficientes de absorção de Hb) e 700 nm (correção da turbidez). A concentração de Hb em g/L foi calculada segundo a equação: C<sub>Hb</sub> (g/L) = 1,55 A<sub>415</sub> – 1,30 A<sub>450</sub> – 1,24<sub>700</sub>, onde a A corresponde aos valores densiométricos obtidos em cada  $\lambda$ .

A concentração de heme total presente no plasma dos animais foi mensurada através do ensaio colorimétrico Quantichrom<sup>™</sup> (DIHM-250), seguindo o protocolo do kit. A densidade ótica de cada amostra corrida em triplicata, foi mensurada em espectrofotômetro a 395 nm. A terminologia "heme total" se refere a todas as formas de heme fora do compartimento celular, excluindo, no entanto, a forma "livre". Isso se deve à afinidade do heme em se ligar a diversas proteínas plasmáticas, impossibilitando, até o momento, a mensuração específica do "heme livre" em matrizes biológicas através dos métodos e kits disponíveis.

#### 4.14.2 Ensaio de viabilidade celular – MTS

A viabilidade celular de HUVECs foi analisada através da técnica colorimétrica, utilizando o kit comercial (CellTiter 96<sup>®</sup> AQueous One Solution Cell Proliferation Assay, Promega). O ensaio se baseia na bioredução do reagente MTS (3- (4,5- dimetil-2-il)-5- (3- carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazólio) por hidrogenases presentes em células metabolicamente ativas, produzindo o composto formazam em quantidade proporcional ao número de células vivas.

O ensaio foi realizado em placas de 96 poços, contendo 200  $\mu$ L de 2x10<sup>5</sup> células/mL/poço, ou sem células (controle negativo) em meio de cultura F12K completo. As células foram cultivadas por 24 horas, em incubadora úmida a 37 °C, 5% CO<sub>2</sub>. Em seguida, o meio de cultura foi removido e os poços foram lavados duas vezes com 200  $\mu$ L PBS, e o um novo meio de cultura F12K contendo 2% ou 0.1% de SFB foi adicionado. As células foram então incubadas com os respectivos tratamentos *in vitro* por 20 horas. Para o controle positivo de morte celular, HUVECs foram igualmente incubadas com TritonX-100 0,25%. Decorrido o

período de tratamento, a placa foi novamente lavada com 200 µL de PBS, e 100 µL solução de MTS (20 µL reagente CellTiter: 100 µL de meio completo) foi adicionado aos poços. Após 3 horas de reação a 37 °C, 5% CO<sub>2</sub>, a formação dos cristais de formazan foi determinada pela leitura da absorbância das amostras em espectrofotômetro (Versamax microplate reader, Molecular Devices) no comprimento de onda de 490 nm.

## 4.15 Análise estatística

Os ensaios foram realizados em duplicata ou triplicata, quando aplicável, e a média aritmética foi calculada para fins de análise estatística. As variáveis foram tratadas como pareadas (culturas de células) e não-pareadas (animais), e paramétricas ou não-paramétricas de acordo com a distribuição gaussiana. Os dados são apresentados na forma de gráficos em barra expressando a média, erro padrão e valores individualizados. Para a comparação entre dois grupos, a probabilidade de diferença (valor de P) foi calculada por meio dos testes t de *student* (Teste t- paramétricas), de Mann-Whitney ou de Wilcoxon (não-paramétricas). Para as comparações entre três grupos ou mais, as amostras paramétricas foram tratadas dentro da análise de variância (ANOVA) e valor P calculado pelo pós-teste de Tukey, Bonferroni, Šídák ou Holm- Šídák; enquanto que as amostras não-paramétrica foram tratadas dentro da análise de Kruskall Wallis e valor de P calculado pelo pós-teste de Dunn. As análises estatísticas e os gráficos foram gerados usando o software GraphPad Prism v. 9 InStat. Um valor de P igual ou inferior a 5% (P $\leq$  0,05) foi considerado significativo.

### **5 RESULTADOS**

## 5.1 Caracterização do modelo in vivo de hemólise intravascular aguda

Para avaliar os efeitos da hemólise intravascular aguda *in vivo*, foram produzidos 1 grupo de animais controles sem hemólise (CON) e 4 grupos de animais que foram submetidos ao processo de hemólise (HEM), divididos em diferentes tempos decorridos do estímulo hemolítico (15 minutos, 1 hora, 3 horas e 6 horas). Todos os animais tinham a mesma idade (4 a 5 meses).

A administração intravascular de água estéril levou aos aumentos significativos e imediatos da concentração de hemoglobina (Figura 3A) e de heme total (Figura 3B) no plasma dos camundongos HEM, dentro de 15 minutos, em comparação aos animais CON. Ainda em relação aos camundongos CON, os altos níveis plasmáticos de hemoglobina e heme dos animais HEM continuaram significativamente elevados por até 1 hora, sendo somente restabelecidos para níveis basais a partir de 3 horas da indução do estímulo hemolítico.



Figura 3. Efeito da indução da hemólise intravascular aguda nos níveis plasmáticos de hemoglobina (Hb) e de heme total em camundongos C57BL6. As dosagens foram realizadas em amostras de sangue coletadas após 15 minutos, 1 hora, 3 horas e 6 horas da administração intravenosa de NaCl 0,9% estéril (CON, em azul, total de n= 19), ou água estéril (HEM, em bordô, n= 5-6). (A) hemoglobina plasmática

e (B) heme plasmático foram mensurados por teste colorimétricos de Fairbanks e Quantichrom<sup>™</sup>, respectivamente. Os resultados estão expressos como médias ± SEM; valor de P determinado por teste de Bonferroni.

Com relação a cinética das concentrações plasmáticas da proteína de remoção de hemoglobina, a haptoglobina (Hp), foi possível observar que a concentração desta proteína esteve reduzida nos animais do grupo HEM, sendo esta diminuição significativa nos períodos de 1 hora e 3 horas (Figura 4A). No entanto, em amostras coletadas após um período prolongado do estímulo de hemólise (grupo HEM de 6 horas), encontrou-se níveis elevados de Hp em comparação aos grupos HEM de 15 min a 3 horas. Esse dado indica o rápido consumo de Hp frente a altos níveis de Hb livre, o que sugere a sua funcionalidade, e a sua restauração ao nível basal 6 horas após um único evento hemolítico.

Ao analisar a concentração plasmática da proteína neutralizante de heme, a hemopexina (Hx), foi observado uma tendência a redução da concentração dessa proteína em animais HEM de 15 minutos a 3 horas em relação ao grupo CON (Figura 4B). Além disso, também foi observado que somente após 6 horas da indução do processo hemolítico, os níveis de Hx tendem a se elevar em relação aos demais grupos HEM e CON, no entanto esse aumento não foi significativo. Em conjunto, esses dados mostram que um único estímulo intravascular de hemólise hipotônica resulta no rápido e significativo aumento plasmático de Hb e heme, em associação com redução expressiva da proteína de remoção de Hb, a Hp, o que confirmam o processo de hemólise intravascular aguda.



Figura 4. Concentração plasmática de haptoglobina e hemopexina após a indução do processo hemolítico intravascular agudo. As dosagens foram realizadas em amostras coletadas após 15 minutos, 1 hora, 3 horas e 6 horas da administração intravenosa de NaCl 0,9% estéril (CON, em azul; n= 10-12), ou água estéril (HEM, em bordô; n= 3). (A) Haptoglobina e (B) hemopexina foram mensuradas pelo método de ELISA. Os resultados estão expressos como médias ± SEM; valor de P determinado por teste de Dunn (A) e teste de Bonferroni (B).

A avaliação do perfil hematológico dos camundongos foi realizada em amostras de sangue total e os parâmetros hematológicos podem ser consultados no Apêndice VI e Figura 5. Os resultados evidenciaram uma mobilização significativa do número de leucócitos totais no grupo HEM após 1 hora, em comparação aos animais CON. De fato, conforme demostrado na Figura 5, as concentrações celulares de granulócitos e monócitos foram significativamente maiores apenas nos grupos HEM 1 hora e 3 horas, quando comparadas ao grupo CON.

A análise citométrica de fluxo do sangue total revelou um aumento significativo da população de granulócitos e mononucleares (FSC x SSC; Apêndice VII) nos camundongos do grupo HEM após 1 hora, em comparação com os animais do grupo CON, conforme mostrado na Figura 6A, confirmando as observações do hemograma. A imunofenotipagem das células sanguíneas totais também indicou um aumento significativo na frequência de células CD11b<sup>+</sup> no período de 1 hora após o estímulo hemolítico, em comparação com os animais do grupo CON (Figura 6B). No entanto, a intensidade global de CD11b nos leucócitos diminuiu de

maneira significativa apenas no grupo HEM 15 minutos (Figura 6C). Não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos HEM 3 horas e CON em relação a esses parâmetros.



Figura 5. Contagens dos números de leucócitos circulantes em camundongos controle salina e camundongos submetidos a hemólise intravascular aguda. As amostras de sangue total foram coletadas após 15 minutos, 1 hora, 3 horas e 6 horas da administração intravenosa de NaCl 0,9% estéril (CON, em azul; n= 33-35), ou água estéril (HEM, em bordô; n= 7-16). A Contagem de leucócitos totais (A), granulócitos (B) e monócitos (C) foi realizada em contador de células automatizado Beckman Coulter<sup>TM</sup>

Ac.T diff. Os resultados estão expressos como médias ± SEM; valor de P determinado por teste de Bonferroni.



Figura 6. Contagens e imunofenotipagem de leucócitos circulantes de camundongos controle salina e camundongos submetidos a hemólise intravascular aguda. As amostras de sangue total foram coletadas após 15 minutos, 1 hora e 3 horas da administração intravenosa de NaCl 0,9% estéril (CON, em azul; n= 36), ou água estéril (HEM, em bordô; n= 6-22). Os ensaios foram realizados por citometria de fluxo em amostras marcadas com anti-CD11b. Em (A) as populações de granulócitos e mononucleares foram diferenciadas por FSC x SSC, e todas as análises subsequentes foram realizadas para a identificação da

frequência de células positivas para CD11b (B) e para expressão total de CD11b (C). Os resultados estão expressos como médias ± SEM; valor de P determinado por teste de Dunn (A) e de Šídák (B-C).

## 5.2 Avaliação da liberação de citocinas pró-inflamatórias de camundongos submetidos ao processo hemolítico estéril agudo

A indução do processo hemolítico *in vivo* também foi capaz de modular a produção de citocinas pró-inflamatórias TNF- $\alpha$  e IL-6. Os resultados exibidos na Figura 7A mostram que os níveis plasmáticos TNF- $\alpha$  se elevaram rapidamente após 15 minutos dado o estímulo hemolítico. Ainda, é possível observar que em períodos mais longos de 3 horas e 6 horas a concentração de TNF- $\alpha$  mantém-se significativamente elevada em relação aos animais sem hemólise.

A hemólise intravascular também elevou os níveis circulantes de IL-6, uma citocina produzida principalmente por monócitos e células endoteliais e em resposta aos estímulos TNF- $\alpha$  e IL-1 (102). Como ilustrado na Figura 7B, em comparação ao grupo CON, nos primeiros 15 minutos os animais HEM apresentaram aumento significativo da concentração de IL-6 plasmática que ainda se manteve elevada por até 3 horas.

Dada a relevância de que neutrófilos e monócitos ativados secretam a proteína citoplasmática S100A8, que atua intensificando a resposta inflamatória, a seguir buscou-se investigar a liberação dessa alarmina durante a hemólise intravascular. Na Figura 7C é possível observar, em comparação ao grupo CON, que a hemólise intravascular aguda induziu um rápido aumento da concentração plasmática de S100A8 que se manteve elevada por até 3 horas após este estímulo, confirmando as observações feitas por Silveira e colaboradores (39). Em conjunto, estes resultados evidenciam que o estímulo hemolítico agudo estéril é capaz de induzir a imediata mobilização de leucócitos e liberação sistêmica de citocinas e alarminas que contribuem para um estado inflamatório agudo.



Figura 7. Avaliação da liberação de moléculas pró-inflamatórias após estímulo de hemólise intravascular aguda. Sangue total dos camundongos foi coletado 15 minutos, 1 hora, 3 horas, ou 6 horas após administração intravenosa de NaCl 0,9% estéril (CON, em azul), ou de estímulo hemolítico (HEM, em bordô) para obtenção de plasma e quantificação da concentração de TNF- $\alpha$  (A: CON n= 16; HEM n= 4-10), de IL-6 (B: CON n= 8; HEM n= 3), e da alarmina S100A8 (C: CON n= 9; HEM n= 6), foram realizadas por ELISA. Os resultados estão expressos como médias ± SEM; valor de P determinado por teste de Dunn (A) e Holm-Šídák (B-C).

# 5.3 Avaliação *in vivo* dos efeitos do processo inflamatório induzido pela hemólise intravascular aguda na microcirculação de camundongos C57BL6

Para investigar os efeitos inflamatórios da hemólise aguda sobre a hemodinâmica microcirculatória, foi utilizado um sistema de fluxometria laser Doppler. Esta técnica não invasiva é baseada no efeito Doppler de um feixe de raios refletidos por células sanguíneas e permite uma avaliação quantitativa *in vivo* da concentração e velocidade de células, e da perfusão sanguínea de uma região delimitada.

A análise de laser Doppler revelou que a hemólise intravascular aguda provocou alterações significativas no fluxo sanguíneo da microvasculatura da pele dos camundongos C57BL6. Conforme pode ser observado na Figura 8C, imediatamente após a hemólise (HEM 15min) ocorreu a diminuição significativa da perfusão sanguínea, a qual se manteve reduzida mesmo após 1 hora da indução de hemólise, quando comparado ao respectivo grupo CON. De maneira importante, o comprometimento da perfusão microvascular induzida pela hemólise esteve associado a redução da velocidade das células sanguíneas, especialmente no grupo de HEM 15 min, onde essa redução foi significativa em relação ao CON (Figura 8B). Adicionalmente, os animais dos grupos HEM apresentaram uma tendência a redução da concentração de células (CMBC) em relação aos grupos CON, no entanto não foi detectada diferença significativa deste parâmetro entre os grupos comparados (Figura 8A).



Figura 8. Efeitos da hemólise intravascular aguda no fluxo sanguíneo periférico de camundongos C57BL6. A técnica não invasiva Laser Doppler foi utilizada para mensurar o fluxo sanguíneo microcirculatório na pele do membro pélvico de camundongos anestesiados, após 15 minutos e 1 hora da administração intravenosa de NaCl 0,9% estéril (CON, em azul; n= 6), ou de estímulo hemolítico (HEM, em bordô; n= 7). As mensurações de concentração (CMBC) e Velocidade de células, e Perfusão sanguínea (A-C, respectivamente) foram realizadas pelo equipamento PeriFlux 6000 (PERIMED<sup>©</sup>). Os valores normalizados representam os valores absolutos corrigidos pela média arbitrária basal (sem estímulos) de cada animal. Os resultados estão expressos como médias ± SEM; valor de P determinado por teste de Šídák.

# 5.4 Investigação da participação de inflamassoma na resposta inflamatória induzida pela hemólise intravascular aguda

Durante a resposta inflamatória, as citocinas são responsáveis por mediar a comunicação entre as células do sistema imune inato e adaptativo. A exemplo, destaca-se a IL- $\beta$  e IL-18 que induzem diversos efeitos sistêmicos, incluindo a produção de proteínas de fase aguda e indução de citocinas a jusante, presente em processos inflamatórios de patologias agudas como sepse, e crônicas como a artrite reumatoide (85) e a anemia falciforme (103). Dada relevância, a seguir, buscou-se avaliar se a hemólise intravascular aguda induz a produção e liberação das citocinas IL- $\beta$  e IL-18.

Conforme ilustrado na Figura 9A, a análise dos níveis de IL- $\beta$  no plasma de camundongos HEM mostrou um aumento acentuado de IL- $\beta$  sustentado por até 3 horas do estímulo de hemólise, em relação aos animais do grupo CON. Os níveis plasmáticos de IL-18 também foram quantificados nestas amostras (Figura 9B), e não foi observado aumento significativo entre os grupos HEM e CON no período de 15 minutos a 3 horas. Em contraste, após longo período de 6 horas, nota-se que a concentração de IL-18 foi maior em animais HEM do que em animais CON. Assim, esses dados inferem que um único estímulo de hemólise intravascular resulta em um quadro de inflamação aguda estéril caracterizado pelo aumento de IL- $\beta$  e IL-18, implicando a formação e ativação do complexo inflamassoma.



Figura 9. Efeito da indução do processo hemolítico intravascular agudo na liberação de Interleucina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) e de IL-18. Amostras de sangue total foi coletado dos camundongos a 15 minutos, 1 hora, 3 horas, ou 6 horas após administração intravenosa de NaCl 0,9% estéril (CON, em azul), ou de estímulo hemolítico (HEM, em bordô) para obtenção de plasma e quantificação, por ELISA, da concentração de IL-1 $\beta$  (A: CON n= 15; HEM n= 4-12) e IL-18 (B: CON n= 19; HEM n= 8-10). Os resultados estão expressos como médias ± SEM; valor de P determinado por Holm-Šídák (A) e teste de Dunnett (B).

# 5.4.1 Investigação dos efeitos da hemólise intravascular aguda na ativação de caspase-1 em neutrófilos e monócitos de camundongos

De maneira importante, a clivagem da forma precursora de IL-1β e IL-18 em suas formas biologicamente ativas é controlada por proteases intracelulares como a capase-1, ativada por inflamassomas em leucócitos e células endoteliais (104). Dada circunstancia do processo de maturação e liberação dessas citocinas, é plausível que este aumento detectado durante o evento hemolítico, decorra da atividade de caspase-1. Diante disso, e ao fato de que foi observado acentuado aumento de granulócitos e monócitos em camundongos HEM (Figura 5), buscou-se explorar *in vivo* os mecanismos celulares envolvidos na liberação dessas citocinas durante um evento agudo de hemólise intravascular. Como estratégia, juntamente com a citometria de fluxo convencional, utilizou-se a sonda intracelular FAM-YVAD-FLICA® para detectar a atividade da caspase-1 em neutrófilos e monócitos de camundongos. Essa sonda, ligada ao inibidor seletivo YVAD-fmk e a um fluoróforo, possibilita a identificação da forma ativada da caspase-1 dentro das células. Com os resultados obtidos, constatou-se que hemólise aguda elevou o número de neutrófilos (Figura 10A,C) e monócitos (Figura 10B,D) com caspase-1 ativada (FLICA<sup>+</sup>) em comparação aos grupos CON, sendo que os monócitos foram as células que apresentaram maior frequência de caspase-1 ativada. Logo, pode-se deduzir que os neutrófilos e monócitos são células, que em resposta ao estímulo hemolítico agudo, podem contribuir rapidamente no processamento de IL- $\beta$  por um mecanismo resultante da ativação de caspase-1.



Figura 10. Avaliação do efeito da hemólise intravascular aguda na ativação de Caspase-1 em neutrófilos e monócitos murinos. Os ensaios foram realizados por citometria de fluxo a partir de sangue total coletado após 15 minutos (A-B) ou 1 hora (C-D) da administração intravenosa de NaCl 0,9% estéril (CON, em azul; n= 6-9), ou de estímulo hemolítico (HEM, em bordô, n= 6-8). Para identificação de neutrófilos foi utilizado anticorpos anti-Ly6G-APC e anti-CD11b-PE (A, C); ou anti-Ly6C-APC e anti-CD43-PE para identificação de monócitos (B, D); e FAM-YVAD-FLICA-FITC para identificação de caspase-1 ativa, e analisados por citometria de fluxo. Os resultados estão expressos como médias ± SEM; valor de P determinado por teste de Mann-Whitney.

Inicialmente produzidas em sua forma inativa, a ativação da caspase-1 requer a sua dimerização que é facilitada por proteínas adaptadoras que permite a interação com os complexos citosólicos inflamassomas. O inflamassoma NRLP3 é ativado por uma infinidade de partículas exógenas e endógenas, não obstante que estudos tem amplamente demostrado a produção de IL- $\beta$  dependente de NLRP3 frente aos produtos do processo hemolítico como heme e ATP (39, 105, 106). Considerando esses aspectos, buscou-se explorar a participação desse inflamassoma na ativação de caspase-1 induzida pela hemólise aguda.

Para tanto, anteriormente ao estímulo de hemólise, os camundongos foram tratados por 1 hora com PBS ou com MCC950 (MCC), um inibidor seletivo do inflamassoma NLRP3. Inicialmente, a ativação de caspase-1 em neutrófilos e monócitos sob o efeito de MCC950 foi verificada por citometria de fluxo, e conforme demostrado na Figura 11, a inibição do inflamassoma NLRP3 resultou na diminuição de caspase-1 ativa tanto de neutrófilos (Figura 11A) quanto de monócitos (Figura 11B) de camundongos HEM MCC em comparação aos HEM PBS. Logo, a diminuição significativa da caspase-1 ativa em ambas as populações celulares em camundongos tratados com MCC950, em comparação com aqueles tratados com PBS, sugere que a atividade de caspase-1 nessas células pode estar relacionada à formação do inflamassoma NLRP3.



Figura 11. Avaliação do efeito do inibidor de inflamassoma NLRP3 (MCC950) in vivo na ativação de Caspase-1 de neutrófilos e monócitos murinos induzida pela hemólise intravascular aguda. Os camundongos foram tratados previamente por 1 hora com MCC950 (50 mg/Kg, i.p.; colunas preenchidas em pontos -MCC) ou com veículo PBS estéril (colunas vazias). Os ensaios foram realizados por citometria de fluxo a partir de sangue total coletado após 1 hora da administração intravenosa de NaCl 0,9% estéril (CON, em azul; n= 5), ou de estímulo hemolítico (HEM, em bordô; n= 5-7). Para a identificação de neutrófilos foi utilizado anticorpos anti-Ly6G-APC e anti-CD11b-PE (A); para identificação de caspase-1 ativa. Os resultados estão expressos como médias ± SEM; valor de P determinado por teste de Šídák.

# 5.4.2 Avaliação da participação do inflamassoma NLRP3 nos processos de inflamação vascular induzidos pela hemólise aguda

A seguir, foi investigado se a formação do inflamassoma NLRP3 participa das alterações microvasculares induzida pelo processo hemolítico agudo. Para tanto, os animais HEM e CON que foram tratados, ou não, com MCC950, foram submetidos a análise de laser doppler para avaliação perfusão sanguínea. Os resultados gerados podem ser consultados na Figura 12, onde é possível notar que a administração de MCC950 reverteu de maneira significativa o comprometimento da perfusão microvascular causado pela hemólise, quando comparado aos valores de perfusão do grupo HEM PBS (Figura 12C). A melhora na perfusão microcirculatória, alcançada pela inibição do inflamassoma NLRP3, pareceu ser acompanhada do aumento da velocidade das células sanguíneas dos animais HEM MCC, entretanto, essa diferença não foi significativa em comparação aos animais HEM PBS (Figura 12B).



Figura 12. Efeitos do inibidor de inflamassoma NLRP3 (MCC950) no fluxo sanguíneo microvascular periférico de camundongos C57BL6 submetidos à hemólise intravascular aguda. Os camundongos foram tratados previamente por 1 hora com MCC950 (50mg/Kg, i.p.; colunas preenchidas em pontos - MCC) ou com veículo PBS estéril (colunas vazias). A técnica não invasiva Laser Doppler foi utilizada para mensurar o fluxo sanguíneo microcirculatório na pele do membro pélvico de camundongos anestesiados após 15 minutos da administração intravenosa de NaCl 0,9% estéril (CON, em azul, n= 7), ou de estímulo hemolítico (HEM, em bordô, n= 9). Os valores normalizados representam os valores absolutos corrigidos pela média arbitrária basal (sem estímulos) de cada animal. Os resultados estão expressos como médias  $\pm$  SEM; valor de P determinado por teste de Šídák (B) e de Dunn (A, C).

É importante ressaltar que alterações na dinâmica microvascular ocorrem durante o processo inflamatório agudo, como consequência da ativação celular e aumento da permeabilidade vascular, visando facilitar a transmigração de leucócitos do sangue para os tecidos adjacentes (107). Nesse contexto, a visualização em tempo real dos fenômenos de rolamento, adesão e extravasamento de leucócitos tem sido reconhecido como indicadores fundamentais da inflamação aguda (108). Diante disso, para investigar os efeitos indiretos do inflamassoma NLRP3 no processo inflamatório vascular, utilizou-se da microscopia intravital, uma técnica que permite a observação e quantificação *in vivo* de recrutamento e transmigração de leucócitos. Os resultados obtidos são mostrados na Figura 13.

A partir dos dados coletados, verificou-se, sobretudo, que um único estímulo hemolítico agudo foi capaz de induzir o aumento de leucócitos em rolamento (Figura 13A) e aderidos (Figura 13B) ao endotélio microvascular, na medida em que induziu o aumento de extravasamento dessas células para o espaço extravascular (Figura 13C). A seguir, observou-se que a inibição do inflamassoma NLRP3, mediante administração de MCC950, reduziu significativamente a adesão de leucócitos ao endotélio em camundongos HEM (Figura 13B). Entretanto, não foram evidenciadas diferenças significativas no rolamento e extravasamento dessas células entre os animais HEM MCC e HEM PBS. (Figura 13A, D). Estes achados sugerem que o inflamassoma NLRP3 desempenha um papel seletivo na modulação da adesão de leucócitos ao endotélio em resposta ao estímulo hemolítico agudo.



Figura 13. Efeito do inibidor de inflamassoma NLRP3 (MCC) no recrutamento e adesão de leucócitos ao endotélio microvascular de camundongos submetidos a hemólise intravascular aguda. Os camundongos foram previamente tratados por 1 hora com MCC950 (50 mg/Kg, i.p.; colunas preenchidas em pontos - MCC) ou com veículo (PBS estéril, colunas vazias). A técnica de microscopia intravital foi realizada no músculo cremaster após 15 minutos da administração intravenosa de NaCl



Figura 14. Imagens representativas de vênulas da microcirculação do músculo cremaster de camundongos C57BL6 após 15 minutos da administração intravenosa de NaCl 0,9% estéril (CON), ou de estímulo hemolítico (HEM). Os animais foram previamente tratados por 1 hora com MCC950 (50mg/Kg, i.p.) ou com veículo (PBS estéril). Os leucócitos aderidos são mostrados nas imagens com asteriscos pretos (\*). Microscopia intravital em aumento de 63X, barra indica escala de 20 µm.

A liberação *in vivo* das citocinas pró-inflamatórias TNF- $\alpha$  e IL- $\beta$  também foi avaliada no plasma de animais tratados, ou não, com MCC950. Na Figura 15 é possível notar que não houve diferença significava entre as concentrações plasmática de TNF- $\alpha$  (Figura 15A) e IL- $\beta$  (Figura 15B) no plasma dos animais HEM PBS e HEM MCC. Entretanto, diferentemente do esperado com base nos resultados prévios, nestes grupos de animais chama atenção o fato de os níveis circulantes de IL- $\beta$  dos animais CON PBS estarem relativamente maiores do que do grupo HEM PBS, enquanto que os de TNF- $\alpha$  permanecerem inalterados entre os grupos citados, o que pode ter comprometido a interpretação dos resultados, e, portanto, esse ensaio necessita de refinamento para confirmação dos dados apresentados.



Figura 15. Concentração plasmática de TNF- $\alpha$  e IL- $\beta$  de camundongos submetidos a hemólise intravascular aguda após tratamento com inibidor de inflamassoma NLRP3 (MCC950). Os camundongos foram previamente tratados por 1 hora com MCC950 (50 mg/Kg; colunas preenchidas em pontos - MCC) ou com veículo (PBS estéril, colunas vazias). Sangue total dos camundongos foi coletado 1 hora após administração intravenosa de NaCl 0,9% estéril (CON, em azul), ou de estímulo hemolítico (HEM, em bordô) para obtenção de plasma e quantificação por ELISA da concentração de TNF- $\alpha$  (A: CON n= 2-3; HEM n= 4-5) e de IL- $\beta$  (B: CON n= 4-5; HEM n= 7-8). Os resultados estão expressos como médias ± SEM; valor de P determinado por teste de Dunn (A) e Tukey (B).

# 5.5 Avaliação da participação de Caspase-1 no processo inflamatório induzido pela hemólise intravascular aguda

Uma vez que não foram observados efeitos completos com a inibição do inflamassoma NLRP3, buscou-se elucidar se a resposta parcialmente atenuada poderia ser mais precisamente atribuída a atividade inerente de caspase-1. Para abordar essa hipótese, optou-se por tratar os camundongos com o composto Ac-YVAD-cmk, um agente inibidor seletivo da caspase-1 (YVAD – 8 mg/Kg) ou com veículo DMSO (0,5% em PBS estéril), 1 hora antes do estímulo hemolítico. A inibição de caspase-1 foi confirmada por análise de citometria de fluxo associada a sonda FAM-FLICA. Conforme esperado, os resultados revelaram uma redução significativa nas contagens de neutrófilos (Figura 16A) e monócitos (Figura 16B) FLICA<sup>+</sup> dos camundongos HEM tratados com YVAD, demostrando a eficácia dessa abordagem seletiva.



Figura 16. Avaliação do efeito do inibidor de Caspase-1 (YVAD) *in vivo* na ativação de Caspase-1 de neutrófilos e monócitos murinos induzida pela hemólise intravascular aguda. Os camundongos foram previamente tratados por 1 hora com YVAD (8 mg/Kg, i.p.; colunas preenchidas em pontos -YVAD) ou com veículo DMSO (0,5% em PBS estéril, colunas vazias). Os ensaios foram realizados por citometria de fluxo a partir de sangue total coletado após 1 hora da administração intravenosa de NaCl 0,9% estéril (CON, em azul; n= 4-5), ou de estímulo hemolítico (HEM, em bordô; n= 5-7). Para a identificação de neutrófilos foi utilizado anticorpos anti-Ly6G-APC e anti-CD11b-PE (A); para identificação de monócitos anti-Ly6C-APC e anti-CD43-PE (B); e FAM-YVAD-FLICA-FITC para

identificação de caspase-1 ativa, por citometria de fluxo. Os resultados estão expressos como médias ± SEM; valor de P determinado por teste de Šídák.

A seguir, a participação da atividade de caspase-1 sobre as alterações hemodinâmicas causadas pela hemólise intravascular aguda foi avaliada por laser doppler na microcirculação dos murinos. Como demostrado na Figura 17, sem alterar a concentração de (CMBC – Figura 17A), a velocidade das células sanguíneas, anteriormente reduzida durante o processo hemolítico, apresentou aumento significativo durante a inibição da caspase-1 quando comparado aos camundongos com hemólise e sem YVAD (Figura 17B). Além disso, o tratamento com YVAD preveniu o comprometimento da perfusão sanguínea nos camundongos após o estímulo hemolítico (Figura 17C). Esses dados sugerem que a caspase-1 desempenha um papel importante na regulação do fluxo sanguíneo microvascular em resposta à hemólise intravascular aguda.



Figura 17. Efeito do inibidor de Caspase-1 (YVAD) no fluxo sanguíneo microvascular periférico de camundongos C57BL6 submetidos à hemólise intravascular aguda. Os camundongos foram previamente tratados por 1 hora com YVAD (8 mg/Kg, i.p.; colunas preenchidas em pontos - YVAD) ou com veículo DMSO (0,5% em PBS estéril, colunas vazias). A técnica não invasiva Laser Doppler foi utilizada para mensurar o fluxo sanguíneo microcirculatório no membro pélvico de camundongos anestesiados após 15 minutos da administração intravenosa de NaCl 0,9% estéril (CON, em azul, n= 6), ou de estímulo hemolítico (HEM, em bordô, n= 6-8). Os dados normalizados representam os valores absolutos corrigidos pela média arbitrária basal (sem estímulos) de cada animal. Os resultados estão expressos como médias  $\pm$  SEM; valor de P determinado por teste de Bonferroni.

Diante desses resultados encontrados, procedeu-se a uma análise mais detalhada dos efeitos da atividade de caspase-1 no processo de recrutamento de leucócitos ao endotélio microvascular, utilizando a microscopia intravital. Como ilustrado a seguir, observou-se que a inibição da caspase-1 proporcionou uma redução significativa, tanto no número de leucócitos em rolamento (Figura 18A), quanto na adesão dessas células ao endotélio em camundongos HEM tratados com YVAD (Figura 18B). Além disso, vale destacar que houve uma tendência à redução no extravasamento de leucócitos nos animais HEM tratados com YVAD em comparação com os animais HEM tratados com DMSO, embora essa diferença não tenha atingido significância estatística. Em conjunto, esses achados evidenciam que durante um evento de hemólise intravascular, a atividade de caspase-1, possivelmente em neutrófilos e monócitos resulta no recrutamento leucocitário, o que pode refletir e contribuir para as alterações hemodinâmicas microvasculares.



Figura 18. Efeito do inibidor de Caspase-1 (YVAD) no recrutamento e adesão de leucócitos ao endotélio microvascular de camundongos submetidos a hemólise intravascular aguda. Os camundongos foram previamente tratados por 1 hora com YVAD (8 mg/Kg, i.p.; colunas preenchidas em pontos - YVAD) ou com veículo DMSO (0,5% em PBS estéril, colunas vazias). A técnica de microscopia intravital foi realizada no músculo cremaster após 15 minutos da administração intravenosa de NaCl 0,9% estéril (CON, em azul, n= 4), ou de estímulo hemolítico (HEM, em bordô, n= 4). Os dados normalizados representam os valores absolutos corrigidos pela média arbitrária basal (sem estímulos) de cada animal. Os resultados estão expressos como médias  $\pm$  SEM; valor de P determinado por teste de Bonferroni.



Figura 19. Imagens representativas de vênulas da microcirculação do músculo cremaster de camundongos C57BL6 após 15 minutos da administração intravenosa de NaCl 0,9% estéril (CON), ou de estímulo hemolítico (HEM). Os animais foram previamente tratados por 1 hora com YVAD (8 mg/Kg, i.p.) ou com veículo DMSO (0,5% em PBS estéril). Os leucócitos aderidos são mostrados nas imagens com asteriscos pretos (\*). Microscopia intravital em aumento de 63X, barra indica escala de 20 μm.

Quanto a liberação de citocinas pró-inflamatórias, o tratamento dos camundongos HEM com YVAD não resultou em redução nos níveis plasmáticos de TNF- $\alpha$  (Figura 20A) ou IL-1 $\beta$  em comparação aos animais HEM DMSO (Figura 20B). Especificamente em relação a IL-1 $\beta$ , observou-se que os animais HEM do grupo veículo, ao contrário do esperado, apresentaram menores níveis plasmáticos dessa citocina em relação aos animais CON.

Entretanto, é de importância salientar que esta discrepância compromete a interpretação dos resultados, e indica a necessidade de refinamento do ensaio para corroborar os dados apresentados.



Figura 20. Efeito do inibidor de Caspase-1 (YVAD) na concentração plasmática de TNF- $\alpha$  e IL- $\beta$  de camundongos submetidos a hemólise intravascular aguda. Os camundongos foram previamente tratados por 1 hora com YVAD (8 mg/Kg; colunas preenchidas em pontos - YVAD) ou com veículo DMSO (0,5% em PBS estéril, colunas vazias). Sangue total dos camundongos foi coletado 1 hora após administração intravenosa de NaCl 0,9% estéril (CON, em azul), ou de estímulo hemolítico (HEM, em bordô) para obtenção de plasma e quantificação, por ELISA, da concentração de TNF- $\alpha$  (A: CON n= 5; HEM n= 5-8), de IL- $\beta$  (B: CON n= 4-5; HEM n= 7-8). Os resultados estão expressos como médias  $\pm$  SEM; valor de P determinado por teste de Bonferroni (A) e Tukey (B).
#### 5.6 Caracterização in vivo do modelo de hemólise crônica

A hemólise intravascular desempenha um papel clinicamente significativo em doenças em que ocorre a hemólise crônica, onde elevados níveis de hemoglobina livre estão associados a manifestações clínicas semelhantes, como trombose, hipertensão pulmonar e disfunção renal (15). Em virtude da constatação de que a hemólise intravascular aguda resulta em inflamação sistêmica e alterações marcantes na microvasculatura, associadas à atividade caspase-1 e inflamassoma, a seguir, buscou-se investigar se essa via da resposta imune inata também é ativada na condição de hemólise crônica.

Para abordar esse objetivo, utilizou-se de um modelo de hemólise intravascular recorrente, desenvolvido por Gotardo e colaboradores, que mimetiza os níveis circulantes de heme e hemoglobina livre observados em doenças caracterizadas por hemólise intravascular crônica (100). De maneira sucinta, os camundongos C57BL6 receberam por via intraperitoneal, baixa dose de fenilhidrazina (PHZ - 10mg/Kg, 3x/semana, a cada 48 horas, por 28 dias). Como grupo controle, camundongos da mesma linhagem receberam solução salina (NaCl 0,9%), seguindo as mesmas condições e período de administração do grupo PHZ. Um terceiro grupo de camundongos foi obtido para confirmar se os efeitos observados durante a indução recorrente da hemólise são independentes da única dose de PHZ injetada. Para isso, estes animais receberam uma dose única de PHZ, e assim como os animais do grupo de hemólise crônica, os camundongos foram sacrificados após 48 horas desta administração. Os resultados deste grupo são apresentados em Apêndice IX e Apêndice XI.

Durante o período de indução da hemólise crônica, amostras de sangue foram coletadas via retro-orbital semanalmente para monitorar os níveis de hemopexina. Conforme ilustrado na Figura 21, em comparação aos animais CON (salina), a administração crônica de PHZ induziu a depleção de Hx. Esta redução significativa foi detectada no 14º dia de indução e se manteve baixa até 28º dia, quando os animais foram sacrificados. Esse dado mostra a remoção constante dessa proteína neutralizante de heme da circulação, e indica a indução da hemólise intravascular recorrente nesses animais.



Figura 21. Concentração dos níveis plasmáticos de hemopexina em camundongos tratados com baixa dose de fenilhidrazina (PHZ, i.p., 10 mg/Kg, 3x/semana, a cada 48 horas, por 28 dias). A quantificação foi realizada por ELISA em amostras de plasma coletadas em cada dia conforme indicado no gráfico, após 48 horas da última administração de (PHZ – Hemólise Crônica) ou NaCl 0,9% (Salina – animais Controle). Os resultados estão expressos como médias ± SEM; valor de P determinado por teste de efeito misto (REML) pós teste de Bonferroni, n=3.

A hemólise intravascular crônica foi capaz de induzir a produção e liberação de IL-1 $\beta$  e IL-18 em camundongos C57BL6. Na Figura 22A e B é possível notar que os níveis plasmáticos de IL-1 $\beta$  e IL-18 se elevaram significativamente nos animais em hemólise crônica com relação aos animais do grupo CON.



Figura 22. Efeito da indução do processo hemolítico intravascular crônico na liberação de Interleucina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) e IL-18. Sangue total dos camundongos foi coletado 48 horas após última administração intraperitoneal de NaCl 0,9% estéril (CON, em azul), ou de fenilhidrazina (PHZ, 10 mg/Kg, 3x/semana/28 dias – HEM Crônica, em vermelho) para obtenção de plasma e quantificação da concentração de IL-1 $\beta$  (A: n= 6) e IL-18 (B: CON n= 7; HEM Crônica n= 10). Os resultados estão expressos como médias ± SEM; valor de P determinado Two-way ANOVA.

# 5.7 Efeitos da hemólise intravascular crônica na atividade de caspase-1 em leucócitos de camundongos

Uma vez que os níveis plasmáticos de IL-1β e Il-18 foram encontrados alterados nos animais HEM Crônica, buscou-se avaliar se este aumento poderia estar associado com a atividade de caspase-1 nos leucócitos desses animais. Em primeiro momento, análise citofluorométrica mostrou, que em relação ao grupo CON, os animais HEM Crônica apresentaram aumento significativo do número de neutrófilos (Figura 23A) e monócitos (Figura 23B) com caspase-1 ativada.



Figura 23. Avaliação do efeito da hemólise intravascular crônica na ativação de caspase-1 em neutrófilos e monócitos murinos. Os ensaios foram realizados por citometria de fluxo a partir de sangue total dos camundongos coletado 48 horas após última administração intraperitoneal de NaCl 0,9% estéril (CON, em azul, n= 6-7), ou de fenilhidrazina (PHZ, 10 mg/Kg, 3x/semana/28 dias – HEM Crônica, em vermelho, n= 8). Para identificação de neutrófilos foi utilizado anticorpos anti-Ly6G-APC e anti-CD11b-PE (A); ou anti-Ly6C-APC e anti-CD43-PE para identificação de monócitos (B); e FAM-YVAD-FLICA-FITC para identificação de caspase-1 ativa por citometria de fluxo. Os resultados estão expressos como médias ± SEM; valor de P determinado por teste t.

Os macrófagos, como componentes essenciais do sistema fagocitário monocelular, são leucócitos essenciais na homeostase do ferro e na modulação da inflamação (109). Diante da importância dos macrófagos nos processos inflamatórios, e, considerando que a hemólise crônica resulta no acúmulo constante de heme (100), a seguir, buscou-se avaliar *in vivo* a participação dos macrófagos no processamento de IL-β durante a hemólise crônica.

Para isso, células não parênquimais do tecido hepático (NPCs), que incluem as células mononucleares, foram isoladas de camundongos HEM Crônica e CON e submetidos à citometria de fluxo para a identificação imunofenotípica e para a avaliação da ativação da caspase-1. Como resultado da análise imunofenotípica das NPCs, foi observado que a hemólise crônica induziu o aumento significativo da população celular F4/80<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup> em comparação aos animais sem estímulo hemolítico (Figura 24A), sugerindo aumento do número de macrófagos no tecido hepático. Tipicamente, a expressão do receptor de manose (CD206)

caracteriza os macrófagos com maior atividade fagocítica, enquanto que no ambiente tecidual pode ser interpretado como características do fenótipo de macrófagos residentes, como por exemplo, células de Kupffer (KC) no figado (110).

Conforme demostrado no gráfico B da Figura 24, notou-se que os animais HEM Crônica apresentaram uma redução de apenas 2% na população de macrófagos residentes F4/80<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>CD206<sup>-</sup> (KC1), em comparação aos animais do grupo CON. Além disso, na Figura 24C, é possível notar que a hemólise crônica induziu um aumento de aproximadamente 10% na população de macrófagos residentes com fenótipo F4/80<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>CD206<sup>+</sup> (KC2). Apesar dessas alterações, não foram encontradas diferenças significativas em ambas as populações ao compará-las com grupo CON.



Figura 24. Efeito da hemólise intravascular crônica no fenótipo de macrófagos murinos. O ensaio de citometria foi realizado em suspensões de células hepáticas não-parênquimais obtidas de tecidos coletados 48 horas após a última administração intraperitoneal de NaCl 0,9% estéril (CON, em azul, n = 13 em A; n= 6 em B; e n= 8 em C), ou de fenilhidrazina (PHZ, 10 mg/Kg, 3x/semana/28 dias – HEM Crônica, em vermelho, n = 14 em A; n= 6 em B; e n= 7 em C). Para identificação de células não-parenquimais (NPCs), a suspensão celular foi incubada com os anticorpos anti-F4/80-PE, anti-CD11b-PerCp (A), e para células de Kupffer (KC) anti-F4/80-PE, anti-CD11b-PerCp e anti-CD206-APC (B, C). Os resultados estão expressos como médias  $\pm$  SEM; valor de P determinado por teste Mann-Whitney (A) e teste t (B-C).

Mais adiante, ao analisar a atividade de capase-1, observou-se que animais do grupo HEM Crônica apresentaram um aumento significativo na frequência de macrófagos F4/80<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>FLICA<sup>+</sup> (Figura 25A). Especificamente, houve um aumento de quase 7 vezes nas células F4/80<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>CD206<sup>-</sup>FLICA<sup>+</sup> (KC1, Figura 25B), indicando uma ativação de caspase-1 mais pronunciada nessa população. Em contraste, a frequência das células F4/80<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>CD206<sup>+</sup>FLICA<sup>+</sup> (KC2, Figura 25C) mostrou um aumento menor na ativação de caspase-1, cerca de 1,8 vezes em comparação com o grupo CON. Esses resultados sugerem que a hemólise intravascular crônica induz uma ativação mais acentuada de caspase-1 nos macrófagos residentes KC1, enquanto os KC2 demonstram um aumento mais moderado nesse processo.

Uma vez que a hemólise crônica provocou um aumento de KC com caspase-1 ativada, buscamos avaliar a liberação de IL-1 $\beta$  madura no fígado dos animais estimulados ou não pelo processo hemolítico intravascular recorrente. Para isso, amostras de tecido hepático foram homogeneizadas para obtenção de extrato proteico total e, posteriormente, submetidas à análise quantitativa de IL-1 $\beta$  solúvel. Conforme observado na Figura 25D, não foi identificada alteração nos níveis hepáticos dessa citocina nos animais HEM Crônica, em comparação ao grupo CON. Este dado evidencia que a hemólise crônica resulta na sensibilização dos macrófagos do tecido hepático para a ativação da caspase-1, o que pode contribuir para o processamento e liberação sistema sistêmica de IL-1 $\beta$ .



Figura 25. Efeito da hemólise intravascular crônica na ativação de caspase-1 de macrófagos murinos e concentração tecidual de IL-1 $\beta$ . O ensaio de citometria foi realizado em suspensões de células hepáticas obtidas de tecidos coletados após 48 horas após a última administração de NaCl 0,9% estéril (CON, em azul, n= 6-8), ou de fenilhidrazina (PHZ, 10 mg/Kg, 3x/semana/28 dias – HEM Crônica, em vermelho, n= 6). Para identificação de células não- parenquimais (NPCs), a suspensão celular foi incubada com os anticorpos anti-F4/80-PE, anti-CD11b-PerCp (A), e para células de Kupffer (KC) anti-F4/80-PE, anti-CD11b-PerCp (A), e para células de Kupffer (KC) anti-F4/80-PE, anti-CD11b-PerCp e anti-CD206-APC (B, C); e FAM-YVAD-FLICA-FITC para identificação de caspase-1 ativa por citometria de fluxo. (D) Os níveis de citocina IL-1 $\beta$  foram medidos por ELISA a partir de homogeneizados hepáticos e os valores obtidos foram corrigidos pela concentração de proteínas total, anteriormente quantificado por Bradford (CON, n= 3; HEM Crônica, n= 4). Os resultados estão expressos como médias  $\pm$  SEM; valor de P determinado por teste t.

# 5.8 Avaliação da formação de inflamassoma em tecido hepático após indução da hemólise intravascular crônica

Para investigar a os mecanismos envolvidos na ativação de caspase-1 em macrófagos residentes hepáticos (KCs) induzida pela hemólise intravascular crônica, as expressões proteicas de IL- $\beta$ , NLRP3 e da caspase-1 foram avaliadas por western blot nos extratos teciduais obtidos dos camundongos HEM Crônica e do grupo CON. Os resultados podem ser consultados na Figura 26.

A expressão de pró-IL-1 $\beta$  (Figura 26A) e da sua forma clivada subunidade p15 (Figura 26B) no tecido não foi alterada pelo estímulo hemolítico intravascular crônico. De maneira interessante, as expressões da pró-caspase-1 (Figura 26C), juntamente com as formas ativadas subunidades p20 e p15 (Figura 26D e E), nos extratos proteicos foram encontradas ligeiramente reduzidas nos animais HEM Crônica, mas sem significância estatística em relação aos animais do grupo CON. No entanto, um aumento significativo da expressão do sensor de inflamassoma NLRP3 foi encontrado nas amostras de camundongos HEM Crônica em comparação aos animais do grupo CON (Figura 26F). Esse dado pode sugerir que possíveis reduções das formas inativas e ativas de caspase-1 decorram do seu consumo pela formação do inflamassoma, e de IL-1 $\beta$ , pela sua liberação na circulação.



Figura 26. Efeito da indução do processo hemolítico crônico na expressão hepática de NLRP3 e formas precursoras e clivadas de IL-1β e caspase-1. A análise da expressão proteica foi realizada por western

blot em amostra de tecido hepático coletada 48 horas após a última administração intraperitoneal de NaCl 0,9% estéril (CON, em azul, n= 4), ou de fenilhidrazina (PHZ, 10 mg/Kg, 3x/semana/28 dias – HEM Crônica, em vermelho, n= 4). A expressão do inflamassoma NLRP3 (A), pró-IL-1 $\beta$  (B) e IL-1 $\beta$  clivada (subunidade p15; C) e de pró-caspase-1(pro casp-1; D) e ativa (casp-1 subunidade p20 e p15; E e F) foram normalizadas usando as correspondentes bandas de GAPDH de cada amostra. (G) Ilustração das reações de western blot em membranas tratadas com os anticorpos primários para as proteínas correspondentes. Os resultados estão expressos como médias  $\pm$  SEM e o valor de P foi determinado por teste t.

## 5.9 Avaliação da participação das células endoteliais na resposta inflamatória induzida por moléculas derivadas do processo hemolítico

Durante a resposta inflamatória, as células endoteliais desempenham uma importante função na iniciação, amplificação e resolução do estímulo inflamatório (107). Devido à sua localização, as células endoteliais estão expostas à Hb e aos seus subprodutos de oxidação durante episódios de hemólise intravascular. Os resultados obtidos *in vivo* através da microscopia intravital sugerem que as células endoteliais podem contribuir significativamente no processo de rolamento e adesão de leucócitos, e possivelmente influenciando a perfusão sanguínea. As observações de alterações microvasculares associadas à formação de inflamassoma e à atividade de caspase-1, levantam uma questão justificável para investigar se essas vias também podem ocorrer nas células endoteliais em resposta aos produtos derivados da hemólise. Nesse sentido, ensaios *in vitro* com HUVEC foram realizados para avaliação da resposta dessas células aos principais produtos derivados da hemólise previamente identificados em altos níveis *in vivo*, o heme e S100A8.

### 5.9.1 Avaliação do efeito do heme na ativação de células endoteliais de cordão umbilical humano

Para avaliar a ativação endotelial induzida por heme, *in vitro*, HUVECs foram cultivadas em placas de 6 poços ( $2x10^5$  células/ poço) e estimuladas com diferentes contrações de heme ( $25 \mu$ M,  $50 \mu$ M e  $100 \mu$ M) por 3 horas. A ativação endotelial foi avaliada pela expressão de moléculas de adesão endotelial ICAM-1 (CD54), VCAM-1 (CD106) e E-selectina (CD62E), através de citometria de fluxo.

Em condição basal, foi observado que aproximadamente 1% de HUVECs expressaram as moléculas ICAM-1, VCAM-1 e E-selectina (Figura 27A-C, respectivamente). O aumento da expressão dessas moléculas de ativação endotelial foi observado após a estimulação com heme, e essa resposta mostrou-se dependente da concentração utilizada. Por exemplo, conforme ilustrado na Figura 27, a presença de heme a 25 µM não teve efeito na frequência de HUVECs positivas para ICAM-1, VCAM-1 e E-selectina, mantendo esta porcentagem próximo aos valores do grupo basal. Em contrapartida, quando as células foram incubadas com o dobro da concentração de heme (50 µM), observou-se um aumento significativo da expressão dessas moléculas de adesão. Por fim, a presença de heme a 100µM resultou em uma expressão ainda maior de ICAM-1, VCAM-1 e E-selectina. Esses resultados confirmam que o heme induz a ativação das células endoteliais para a expressão de moléculas de adesão, sendo este efeito mais evidente a partir da concentração mediana de heme.



Figura 27. Avaliação da expressão de moléculas de adesão de células endoteliais de cordão umbilical humano (HUVECs) estimuladas com heme. As células  $(2x10^5)$  foram cultivadas em meio F12K suplementado com 2% de soro fetal bovino (SFB) por 3 horas na presença de heme  $(25 - 100 \mu M)$  ou na ausência dos estímulos (Basal) a 37°C, em 5% de CO<sub>2</sub>. A porcentagem de HUVECs que expressam ICAM-1, VCAM-1 e E-selectina foram avaliadas por citometria de fluxo. Os resultados estão expressos como médias  $\pm$  SEM para culturas em duplicatas ou triplicatas e são representativos de 6 a 9 experimentos independentes. Valor de P determinado por teste de Šídák.

### 5.9.2 Investigação do efeito do heme na liberação de moléculas inflamatórias de células endoteliais

Uma vez que foi identificado que a hemólise intravascular aguda promoveu a liberação de S100A8, em seguida, procurou-se avaliar a habilidade de heme, também encontrado em elevada concentração após estimulo de hemólise in vivo, em induzir in vitro, a secreção da alarmina S100A8 por células endoteliais. Conforme evidenciado na Figura 28, o heme desencadeou a liberação de S100A8 pelas HUVECs. Inicialmente, foi observado que na concentração mais baixa de heme (25 µM), houve uma tendência de aumento dessa alarmina em comparação ao grupo basal. No entanto, os níveis mais elevados de S100A8 no sobrenadante foram alcançados quando as HUVECs foram estimuladas com heme a 50 µM, sendo esse aumento significativo em comparação aos valores das células não estimuladas. Por outro lado, quando as células foram expostas a uma concentração elevada de heme (100 µM), ocorre uma tendência a redução da liberação de S100A8 em relação as células não estimuladas. Isso poderia sugerir efeito citotóxico de heme em altas concentrações. Para testar essa hipótese, as células endoteliais foram estimuladas com heme por 20 horas nas três concentrações utilizadas e em seguida, a viabilidade celular foi verificada por meio de ensaio de MTS. Como pode ser observado na Figura 29, os resultados mostraram que não houve redução da viabilidade de células expostas ao heme, mesmo em maior concentração, em comparação com as células mantidas na condição basal.



Figura 28. Avaliação da liberação de moléculas pró-inflamatórias de células endoteliais de cordão umbilical humano (HUVECs) estimuladas com heme. As células  $(2x10^5 \text{ células/mL})$  foram cultivadas em meio F12K suplementado com 2% SFB por 3 horas na presença de heme (25 - 100µM) ou na ausência de estímulo (Basal), a 37C° em 5% de CO<sub>2</sub>. A mensuração de S100A8 (A), Interleucina (IL)-6 (B), IL-8 (C) e MCP-1 (D) no sobrenadante foi realizada por ELISA. Os resultados estão expressos como médias ± SEM, representativos de duplicatas ou triplicatas de 5 culturas independentes. Valor de P foi determinado por teste de Bonferroni em (A: Basal n= 14, Heme 25 µM n= 10, Heme 50 µM n= 18, Heme 100 µM n= 5); ou teste de Šídák em (B: Basal n= 6, Heme 25 µM n= 7, Heme 50 µM n= 7, Heme 100 µM n= 5); (C: Basal n= 6, Heme 25 µMn = 5, Heme 50 µM n= 6, Heme 100 µM n= 4); (D: Basal n= 6, Heme 25 µM n= 7, Heme 50 µM n= 7, Heme 50 µM n= 6, Heme 25 µM n= 5).



Figura 29. Viabilidade de células endoteliais de cordão umbilical humano (HUVECs) estimuladas com heme. As células ( $2x10^5$  células/mL) foram cultivadas em meio F12K suplementado com 2% SFB por 20 horas na presença de heme ( $25 - 100 \mu$ M) ou na ausência de estímulo (Basal), a 37°C em 5% de CO<sub>2</sub>. A formação de formazan foi mensurado por absorbância a 490nm após incubação com MTS por 150 minutos a 37°C. Os resultados estão expressos como médias ± SEM representativos de triplicatas de 4 culturas independentes. Valor de P foi determinado por teste de Šídák, n= 4.

# 5.9.3 Avaliação da indução da atividade de caspase-1 e liberação de IL-1β em células endoteliais estimuladas com heme

A incubação das células endoteliais HUVECs com o heme também resultou na ativação de caspase-1 de maneira dependente de concentração. Conforme representado na Figura 30A, o número de células com caspase-1 ativada duplicou quando incubadas com heme 50  $\mu$ M, e, na dose mais elevada de heme (100  $\mu$ M) ocorreu um aumento de aproximadamente 3 vezes no número de células com caspase-1 ativada (HUVECs FLICA<sup>+</sup>) em comparação com as células em condição basal. Além disso, observou-se que na concentração de 50  $\mu$ M, o heme foi capaz de induzir a liberação de IL- $\beta$  no sobrenadante da cultura, conforme demostrado na Figura 30B.



Figura 30. Avaliação de caspase-1 ativa em células endoteliais de cordão umbilical humano (HUVECs) estimuladas com heme. As células ( $2x10^5$  células) foram cultivadas em meio F12K suplementado com 2% SFB (soro fetal bovino) por 3 horas na presença de heme (A: 25 µM a 100 µM; ou B: 50 µM) ou na ausência de estímulo (Basal) a 37°C, em 5% de CO<sub>2</sub>. (A) A porcentagem de HUVECs com caspase-1 ativa foi identificada pela sonda fluorescente FAM-YVAD-FLICA-FITC por citomeria de fluxo. (B) A quantificação de IL- $\beta$  foi realizada em sobrenadante das culturas através de ELISA. Os resultados estão expressos como médias ± SEM, representativos de duplicatas ou triplicatas de 9 culturas independentes. Valor de P determinado por teste de Šídák em (A: Basal e Heme 50 µM n= 19; Heme 25 e 100 µM n= 12) e teste t em (B: n= 14).

### 5.9.4 Avaliação do efeito do heme na indução da ativação de inflamassoma em células endoteliais

Em seguida, procurou-se investigar se o heme poderia induzir a sensibilização das células endoteliais para a formação do inflamassoma. Primeiramente, os níveis de mRNA da caspase-1 foram avaliados por meio de análise de PCR quantitativo em HUVECs estimuladas, ou não com a dose intermediária de heme (50  $\mu$ M). Observou-se que o heme provocou um aumento significativo na expressão do mRNA de *CASP1* em comparação com as células não estimuladas (Figura 31A). Posteriormente, buscamos avaliar a expressão de mRNA do receptor *NLRP3* e de *PYCARD*, uma proteína adaptadora para o recrutamento de caspase-1 ao inflamassoma do NLRP3 (111). Como mostrado na Figura 31B, o heme resultou em um

aumento de quase 2 vezes na expressão de mRNA de *PYCARD* e *NLRP3*, embora essa diferença não tenha alcançado significância em comparação com o grupo basal. Por fim, avaliou-se os níveis de mRNA de *IL18* em HUVECs. Conforme demonstrado na Figura 31D-E, os níveis de mRNA de *IL18* e *IL18* apresentaram uma tendência de aumento em cerca de 2 vezes em relação às células do grupo basal. Em conjunto, esses dados sugerem que o heme, além de promover o aumento da atividade de caspase-1 de células endoteliais, também induz a transcrição de genes envolvidos na ativação da caspase-1 e de proteínas para a formação de inflamassoma NLRP3.



Figura 31. Efeito do heme na indução da expressão gênica de caspase-1 de proteínas do inflamassoma em células endoteliais de cordão umbilical humano (HUVECs). As células ( $2x10^5$  células) foram cultivadas em meio F12K suplementado com 2% SFB (soro fetal bovino) por 3 horas na presença de heme (50 µM), ou na ausência de estímulo (Basal) a 37°C, em 5% de CO<sub>2</sub>. A expressão de mRNA de *CASP1* (A: n= 8), *PYCARD* (B: n= 6), *NLRP3* (C: n= 8), *IL18* (D: n= 6) e de *IL1B* (E: n= 2) foi

determinada por PCR quantitativa e normalizadas pelos genes reconstitutivos  $\beta$ -actina e GAPDH utilizando gNorm software. Os resultados estão expressos como médias  $\pm$  SEM de culturas em duplicatas e são representativos de  $\leq$  5 experimentos independentes. Valor de P determinado por teste de Wilcoxon (A) e teste t (B-E).

#### 5.9.5 Avaliação dos efeitos de S100A8 na ativação de células endoteliais induzida por heme

Demais estudos *in vitro* mostraram que alarmina S100A8 potencializa os efeitos do heme na produção de IL-1β em macrófagos humanos, sugerindo que S100A8 também pode atuar como sinal 1 (*priming*) na ativação de inflamassoma durante o processo hemolítico estéril (96, 97). Apesar dos dados demostrando os efeitos de S100A8 e heme em leucócitos, não se sabe ainda se essa alarmina, associada ou não ao heme, contribui para a ativação endotelial, na formação de inflamassomas e ativação de caspase-1.

Primeiramente, buscou-se investigar os efeitos de S100A8 isoladamente na expressão de moléculas adesão endotelial. Conforme representado na Figura 32, observou-se que na presença exclusiva de S100A8 houve uma tendência à redução da expressão de ICAM-1 (Figura 32A) e E-selectina (Figura 32B), mas nenhuma alteração na expressão VCAM-1, quando comparadas à condição basal. Em seguida, buscou-se investigar se a pré-sensibilização de células endoteliais com S100A8 poderia modificar a expressão dessas moléculas de adesão induzidas por heme. Os resultados revelaram que a adição antecipada de S100A8 não alterou de maneira significativa a expressão das moléculas de adesão ICAM-1, E-selectina ou VCAM-1.



Figura 32. Efeitos da S100A8 na ativação de células endoteliais de cordão umbilical humano (HUVECs) induzida por heme. As HUVECs ( $2x10^5$  células) foram incubadas na ausência dos estímulos (Basal) ou na presença de heme (50 µM) por 3 horas, ou pré-estimuladas com S100A8 (1 µg/mL) por 3 horas antes da incubação com heme, em meio F12K suplementado com SFB 2%, a 37°C, em 5% de CO<sub>2</sub>. As porcentagens de HUVECs que expressam ICAM-1, VCAM-1 e E-selectina foram avaliadas por

citometria de fluxo. Os resultados estão expressos como médias  $\pm$  SEM, representativos de duplicatas ou triplicatas de 8 a 9 culturas independentes. Valor de P determinado por teste de Holm-Šídák.

Posteriormente, avaliou-se a capacidade de S100A8 em induzir a liberação de citocinas pró-inflamatórias em culturas de HUVECs. Na Figura 33, em comparação à condição basal, observa-se que a alarmina S100A8 não estimulou, de maneira significativa, a liberação de IL-6 (Figura 33A), MCP-1 (Figura 33C), e de IL-8 (Figura 33B) pelas células endoteliais. Finalmente, quando as culturas de HUVECs foram pré-sensibilizadas com S100A8 e em seguida estimuladas com heme, observou-se o aumento significativo das concentrações dessas citocinas em comparação com as células basal. Chama a atenção o fato de a co-incubação de S100A8 com heme reverteu significativamente a liberação de IL-8 quando comparada a S100A8 isolada, além de elevar os níveis de IL-6 e MCP-1, comparada às células sem estímulo.



Α

IL-6 sobrenadante (pg/mL)

Figura 33. Produção de moléculas pró-inflamatórias por células endoteliais de cordão umbilical humano (HUVECs) após estímulos com S100A8 e heme. As HUVECs ( $2x10^5$  células) foram incubadas na ausência dos estímulos (Basal) ou na presença de heme ( $50 \mu$ M) por 3 horas, ou pré-estimuladas com S100A8 ( $1\mu$ g/mL) por 3 horas antes da incubação com heme por mais 3 horas em meio F12K suplementado com SFB 2%, a 37°C, em 5% de CO<sub>2</sub>. As mensurações de IL-8 (A), IL-6 (B) e MCP-1 (C) no sobrenadante de diferentes culturas em duplicatas (A; n =6-12), (B-C; n =6-14) foram realizadas por ELISA. Os resultados estão expressos como médias  $\pm$  SEM, representativos de duplicatas ou

triplicatas de 5 culturas independentes. Valor de P determinado por teste de Šídák em (A) e Holm-Šídák em (B-C).

#### 5.9.6 Efeito de S100A8 no processamento de IL-1β por células endoteliais

A seguir procurou-se avaliar os efeitos de S100A8 no processamento de IL-1 $\beta$  em células endoteliais. Conforme ilustrado na Figura 34A, notou-se um aumento significativo de quase 10 vezes na liberação de IL-1 $\beta$  pelas HUVECs na presença de S100A8 em comparação com a condição basal, surpreendentemente superando em 2,5 vezes a liberação induzida por heme. Além disso, a pré-sensibilização das células HUVEC com S100A8, seguida da incubação com heme, resultou em uma amplificação significativa na liberação de IL-1 $\beta$  em comparação com os estímulos isolados. Esses resultados, além de corroborar que na presença de S100A8 as células endoteliais HUVECs liberam IL-1 $\beta$ , mostram, de maneira inédita, que essa alarmina também potencializa o mecanismo pelo qual o heme induz a liberação dessa citocina em células endoteliais.

Para investigar se os mecanismos celulares que S100A8 em combinação com o heme na liberação de IL-1 $\beta$  pelo endotélio envolvem a ativação de caspase-1 nessas células, analisou-se a HUVECs FLICA<sup>+</sup> em resposta aos estímulos. Conforme ilustrado na Figura 34B, a incubação das células com S100A8 isoladamente não alterou a frequência de HUVECs com caspase-1 ativada. Apesar da estimulação com heme após incubação com S100A8 resultar em um aumento da atividade de caspase-1 das células endoteliais em relação à condição basal, este aumento não foi maior do que nas células tratadas com heme sozinho. Isso sugere que a S100A8, embora induza a liberação de IL-1 $\beta$ , não estimula diretamente a atividade de caspase-1 de células endoteliais, e não interfere no efeito de heme sobre a clivagem dessa protease.



Figura 34.Avaliacao da produção de IL-1 $\beta$  e ativação de caspase-1 em células endoteliais de cordão umbilical humano (HUVECs) na presença de S100A8 e heme. As HUVECs (2x10<sup>5</sup> células) foram incubadas na ausência dos estímulos (Basal) ou na presença de heme (50 µM) por 3 horas, ou préestimuladas com S100A8 (1 µg/mL) por 3 horas antes da incubação com heme por mais 3 horas. As incubações foram conduzidas em meio F12K suplementado com 2% SFB, a 37°C, em 5% de CO<sub>2</sub>. (A) A quantificação por ELISA de IL- $\beta$  foi realizada em sobrenadante de culturas independentes em duplicatas. (B) A porcentagem de HUVECs com caspase-1 ativa foi identificada pela sonda fluorescente FAM-YVAD-FLICA-FITC através de citometria de fluxo. Os resultados estão expressos como médias ± SEM, e são representativos de 8 culturas independentes. Valor de P determinado por teste de Holm-Šídák em (A: Basal n= 17; S100A8 n= 6; Heme 50 µM n= 16; S100A8 + Heme 50 µM n= 18).

# 5.9.7 Efeitos da alarmina S100A8 no *priming* de células endoteliais para a formação de inflamassoma

Uma vez que não foram observados efeitos diretos de S100A8 na atividade de caspase-1, em sequência, procurou-se avaliar se os efeitos de S100A8 estariam relacionados à sua capacidade de induzir o *priming*, ou seja, estimular a expressão dos fatores necessários para a maquinaria responsável pela clivagem de IL-1β, como por exemplo o inflamassoma NLRP3. Para isso, foram mensurados os níveis de mRNA de *CASP1, PYCARD, NLRP3, IL1B* e *IL18* por PCR quantitativo.

Conforme mostrado na Figura 35A, a presença de S100A8 aumentou de maneira significativa os níveis de mRNA de *CASP1*, alcançando valores semelhantes ao induzido pelo heme. A expressão de mRNA de *CASP1* também foi avaliada nas condições de *priming* com S100A8 e co-incubação com heme. Como resultado, a combinação desses estímulos resultou em um significativo aumento nos níveis de mRNA de *CASP1*, tanto em comparação ao basal, quanto em relação a S100A8 e heme isolados. Esses resultados indicam um sinergismo entre heme e S100A8 na indução da produção de caspase-1. Houve também tendências de aumento nos níveis de mRNA de *PYCARD* nas células estimuladas com S100A8, mas essas alterações não foram estatisticamente significativas em comparação aos níveis basais (Figura 35B). Além disso, não foram detectadas diferenças significativas entre os grupos para a transcrição de mRNA dos genes para o inflamassoma *NLRP3* (Figura 35C), ou para as *IL18* (Figura 35D) e *IL1B* (Figura 35E) entre os grupos analisados.



Figura 35. Efeito de S100A8 e heme na indução da expressão gênica de caspase-1 e de proteínas do inflamassoma em células endoteliais de cordão umbilical humano (HUVECs). As células ( $2x10^5$  células) foram incubadas na ausência dos estímulos (Basal) ou na presença de heme (50 µM) por 3 horas, ou pré-estimuladas com S100A8 (1 µg/mL) por 3 horas antes da incubação com heme por mais 3 horas. As incubações foram conduzidas em meio F12K suplementado com 2% SFB, a 37°C, em 5% de CO<sub>2</sub>. A expressão de mRNA de *CASP1* (A: n= 8), *PYCARD* (B: n= 6), *NLRP3* (C: n= 8), *IL18* (D: n= 6) e *IL1B* (E: basal e heme n= 2, S100A8 n= 4; nq = não quantificável) foi determinada por PCR quantitativa e normalizadas pelos genes constitutivos  $\beta$ -actina e *GAPDH* utilizando gNorm software. Os resultados estão expressos como médias ± SEM de culturas em duplicatas e são representativos ≤ 5 experimentos independentes. Valor de P determinado por teste Holm-Šídák (A e B), teste de Dunnett (C) e teste Šídák (D-E).

#### 6 DISCUSSÃO

As desordens hemolíticas têm sido extensivamente investigadas, reconhecendo-se como contribuintes importantes para diversas manifestações patológicas, como hipertensão pulmonar e danos a órgãos (22, 112, 113). A hemólise intravascular, ao gerar hemoglobina livre, inicia processos rápidos de oxidação que comprometem a biodisponibilidade do NO, geram a formação de radicais livres, ativação plaquetária e a liberação da molécula heme, resultando diretamente na disfunção endotelial e inflamação (114). Estudos mais recentes apontam o heme e Hb como potentes DAMPS derivados da hemólise com a capacidade de desencadear a formação de inflamassomas em macrófagos, liberação de NETs e ativação de células endoteliais, via sinalização de ROS, e possivelmente intermediado pelo TLR4 (33). Esses achados ressaltam o papel significativo da hemólise intravascular, independentemente dos fatores desencadeantes, na indução da resposta imune inata e adaptativa (115).

Neste estudo, investigamos os efeitos in vivo da hemólise intravascular aguda e crônica na resposta imune inata, visando explorar os possíveis mecanismos inflamatórios envolvidos na ativação celular que podem contribuir para a fisiopatologia compartilhada das doenças e desordens hemolíticas. Para atingir esses objetivos, empregamos dois modelos murinos de hemólise intravascular, previamente desenvolvidos pelo nosso grupo de pesquisa. O modelo de hemólise aguda consiste na indução da lise hipotônica das hemácias, promovida por uma única administração de água estéril (99). Já o segundo modelo, voltado à indução de hemólise crônica, baseia-se na lise dos eritrócitos provocada pela peroxidação da membrana, realizada com doses reduzidas e repetidas de fenilhidrazina (100). Uma distinção fundamental a ser destacada em nossos modelos, em relação a estudos anteriores, é que, ao contrário das abordagens prévias que se concentraram em induzir hemólise maciça ou infusão contínua de heme ou Hb (37, 38, 116-119), os modelos desenvolvidos por Almeida e Gotardo, implementados neste estudo, buscam replicar uma hemólise intravascular moderada, tanto aguda quanto crônica. Especificamente, essas estratégias que têm como alvo a ruptura dos eritrócitos, tem se mostrado eficiente em mimetizar manifestações clínicas associadas à hemólise. Vale ressaltar que, embora existam modelos de doenças que manifestam processos hemolíticos, esses animais também apresentam mecanismos de doença distintos em relação à sua patologia. Como exemplo, os modelos murinos transgênicos para a anemia falciforme demonstram uma diminuição na integridade da barreira intestinal, resultando na translocação de produtos bacterianos para a circulação e influenciando uma resposta inflamatória extrínseca à hemólise (120). Assim, nossos modelos de hemólise, ao ter como alvo a ruptura específica das hemácias, destacam-se por proporcionar uma compreensão mais abrangente e generalizada dos princípios subjacentes à hemólise, sem se restringir a uma condição específica.

Os resultados apresentados neste trabalho mostram que, no modelo de hemólise intravascular aguda, um único estímulo in vivo é suficiente para desencadear uma série de efeitos dinâmicos, notavelmente, influenciando os níveis de Hb e heme na circulação sanguínea. A administração intravascular de água estéril resulta em aumentos imediatos e significativos dessas moléculas nos camundongos submetidos à hemólise aguda, evidenciando a rápida liberação de hemoglobina e heme na corrente sanguínea assim como anteriormente demostrado por Almeida e colaboradores (99). Além disso, a persistência desses níveis elevados por até 1 hora sugere uma contínua liberação das moléculas mesmo após o evento hemolítico inicial. A característica de normalização gradual dos níveis de Hb e heme após 3 horas da indução hemolítica aguda, indica que o organismo pode, ao longo do tempo, lidar eficientemente com os produtos liberados durante a hemólise, possivelmente por meio de processos de remoção e metabolismo. No plasma, diversas proteínas podem contribuir para controlar os níveis extracelulares de Hb ou heme, entretanto as proteínas haptoglobina (Hp) e hemopexina (Hx) são mais eficientes na remoção, por possuírem maior afinidade a Hb e ao heme, respectivamente (121). De fato, quando analisadas as concentrações Hp e Hx, nós observamos que os níveis dessas proteínas seguem uma cinética inversa às concentrações de Hb e heme.

Em condições normais, os níveis plasmáticos de Hp permanecem relativamente constantes, variando entre 0,3 a 3 mg/mL (122). Em situações de hemólise leve ou durante episódios de hemólise aguda, a Hp funciona como primeira linha de proteção contra os danos oxidativo de Hb nos tecidos. No entanto, esse controle da toxicidade da Hb ocorre ao custo de um consumo muito alto dos *scavengers*, o que pode causar a depleção da Hp em questão de horas (22). De maneira consistente, em nossos dados, encontramos que um único estímulo de hemólise intravascular foi capaz de levar à imediata redução dos níveis plasmáticos de Hp, especialmente nos períodos de 1 hora e 3 horas, sugerindo um rápido e sustentado consumo dessa proteína em resposta aos altos níveis de hemoglobina livre. Sabe-se que os complexos Hb:Hp são igualmente degradados no sistema monofagocítico (109), e portanto, a redução constante de Hp por até 3 horas encontrados em nossos dados pode refletir a funcionalidade da Hp na remoção da Hb liberada durante a hemólise, enquanto a capacidade de recuperação gradual da Hp aos níveis basais após 6 horas indica uma resposta ao término do estresse hemolítico. Apesar de observamos a efetividade de neutralização de Hb e consequente depleção

de Hp, nós observamos que esse mecanismo não foi o suficiente para prevenir o aumento subsequente de heme plasmático durante o estímulo de hemólise intravascular aguda.

A capacidade limitada da Hp em conter a liberação de heme, evidenciada pelo rápido esgotamento em questão de minutos, destaca a necessidade de um mecanismo adicional para a contenção dos efeitos do heme. A hemopexina (Hx) apresenta uma grande afinidade pelo heme, o que leva à formação de complexos Hx:heme em condições em que há excesso de heme livre (121). Quando analisados os níveis de Hx, observamos uma tendência à redução de sua concentração nos animais submetidos a hemólise intravascular aguda de 15 minutos a 3 horas, mesmo período que foi observado elevação de heme plasmático, o que evidencia o consumo de Hx pelo aumento de heme livre nos períodos analisados. Contrariamente à Hp, não observamos uma redução completa dos níveis de Hx, sugerindo que a Hp, funcionando como a primeira linha de proteção, permite que a Hx seja poupada até que a capacidade do sistema de proteção primária seja esgotada. Além disso, enquanto Hp é degrada após a sua internalização, parte da Hx retorna para a circulação após a sua dissociação com o heme nos macrófagos (109, 123, 124), o que pode justificar a manutenção dos níveis de Hx durante os tempos de 15 minutos a 3 horas do único estímulo de hemólise aguda. A elevação tardia, embora não significativa, dos níveis de Hx após 6 horas do estímulo hemolítico sugere uma resposta compensatória, possivelmente relacionada à neutralização do heme extracelular, dissociação do complexo Hx:heme, e finalmente, caracterizando o término do estresse hemolítico (117, 125, 126).

Esses dados, projetados em função do tempo, realçam a complexidade adaptativa e dinâmica do sistema de homeostático em resposta à hemólise intravascular aguda, onde a Hp e Hx desempenham papel importante na modulação da resposta inflamatória nos processos hemolíticos (123). Não obstante que terapias voltadas para o aumento ou regulação de Hp e Hx tem sido demostradas prover efeitos protetivos, não somente em desordens hemolíticas, mas também em doenças caracterizadas pelo estresse oxidativo (117, 127, 128).

Os efeitos do heme e da Hb livres na indução da resposta inflamatória, seja por meio da geração de espécies reativas de oxigênio (ROS), ou pela ativação dos receptores do sistema imune inato e do complemento, foram extensivamente explorados por outros pesquisadores (33, 129-132). Pesquisas anteriores de nosso grupo demonstraram de maneira eficaz que o consumo de óxido nítrico (NO) na vasculatura, provavelmente resultante das reações de oxidação com Hb livre, é um fator que contribui significativamente para o recrutamento de leucócitos na microvasculatura durante um único estímulo de hemólise intravascular hipotônica (99, 133-135). Dutra e colaboradores demostraram que durante a infusão de heme ou de lisado de hemácias o recrutamento de neutrófilos para o peritônio foi dependente da ativação de NLRP3 (38). Ambos os estudos evidenciam a capacidade dos produtos da hemólise em desencadear respostas inflamatórias e atrair células do sistema imunológico para os locais de interesse, demonstrando a influência do processo hemolítico na ativação e no número de leucócitos.

Em nossos resultados também observamos uma variação da mobilização de leucócitos para a circulação no período de 15 minutos e 1 hora após o estímulo de hemólise intravascular aguda, e possivelmente associada ao processo de recrutamento de leucócitos in vivo. Através das análises de microscopia intravital, confirmamos um aumento significativo no número de leucócitos em rolamento, aderidos e extravasados na microvasculatura dentro dos primeiros 15 minutos em resposta à hemólise intravascular aguda. Em associação à citometria de fluxo, no mesmo período, observamos que em resposta ao estresse hemolítico agudo, ocorre uma redução dos leucócitos com fenótipo CD11b<sup>+</sup>, especialmente da população granulocítica. Vale ressaltar que dados obtido em outro trabalho do nosso grupo (Chweih, não publicado), revelaram que sob o potente estímulo inflamatório de TNF- $\alpha$ , neutrófilos Ly6G<sup>+</sup> são recrutados para a parede vascular mediando os processos do tipo vaso-oclusivos (136). Entretanto, após 1 hora da indução da hemólise, foi observada a inversão desse quadro, com o aumento do número total de leucócitos circulantes e das populações celulares CD11<sup>+</sup>, indicando a ativação celular pró-infamatória. Dessa forma, pode-se propor que, logo após a hemólise intravascular, os neutrófilos são potencialmente, as células primeiramente recrutadas. Isso sugere que a migração de outras células ocorre tardiamente, em um período mais estendido da hemólise aguda, contribuindo ambas para a propagação do processo inflamatório sistêmico, conforme observado por Almeida e colaboradores (99).

Para avaliar os efeitos dessa dinâmica na mobilização e recrutamento de leucócitos ao endotélio microvascular, nós investigamos o perfil hemodinâmico desses animais, já que processos de oclusão vascular estão associado eventos de isquemia e hipoxia nos tecidos (137-139). Determinamos avaliar essas alterações nos períodos de 15 minutos e 1 hora, pois foram os períodos em que encontramos as variações no perfil da mobilização de leucócitos durante a hemólise aguda. Ao investigar os efeitos da hemólise aguda na microvasculatura, através da aplicação da técnica de fluxometria laser Doppler, obtivemos dados notáveis que até então não haviam sido explorados. Demostramos que um único estímulo de hemólise intravascular aguda resulta na rápida e significativa diminuição da velocidade das células sanguíneas e no fluxo sanguíneo, sendo essa redução mais pronunciada nos primeiros 15 minutos. Este acho foi concomitante à redução do número de leucócitos circulantes e aumento de células não somente em rolamento e aderidas à microvasculatura, mas também extravasadas, confirmando o processo de quimiotaxia e migração de leucócitos mesmo após um único estímulo de hemólise intravascular aguda. Embora não tenhamos dados específicos sobre o recrutamento de leucócitos na hemólise de 1 hora, a persistente redução na velocidade das células ainda neste tempo, sugere que o recrutamento de leucócitos à microvasculatura ainda pode estar ocorrendo. Essa constatação é especialmente relevante, visto que demonstramos que tanto nos períodos de 15 minutos quanto de 1 hora, a hemólise intravascular aguda resultou em uma diminuição significativa da perfusão microvascular cutânea dos animais. Essas descobertas são fundamentais para a compreensão dos mecanismos envolvidos no recrutamento de leucócitos que resultam no comprometimento da oferta de sangue aos tecidos, e eventualmente, a lesão de órgãos.

Por conseguinte, este trabalho evidencia uma interação complexa entre a resposta inflamatória e as características microcirculatórias, que podem contribuir significativamente para nosso entendimento da inflamação vascular em condições de hemólise aguda. Para explorar as consequências dessas interações, avaliamos as concentrações das principais citocinas frequentemente elevadas em doenças hemolíticas e associadas a exacerbação do estado inflamatório. Os resultados revelaram um aumento significativo nos níveis plasmáticos de TNF- $\alpha$  logo após um único evento de hemólise intravascular, mantendo-se elevados após 3 e 6 horas. Dado que o TNF- $\alpha$  é liberado por neutrófilos, monócitos e macrófagos ativados, desempenhando um papel central na iniciação e amplificação da resposta inflamatória (140), esses achados destacam a rápida ativação dos leucócitos após único evento de hemólise intravascular. Além disso, observamos um aumento rápido e persistente de IL-6 e IL-1 $\beta$ , citocinas já reconhecidas como contribuintes importantes para o processo de quimiotaxia e infiltração de leucócitos (141, 142).

A maturação da pró-IL-1 $\beta$  em sua forma ativa, relacionada aos produtos resultantes do processo hemolítico, é conhecida por depender da formação do inflamassoma NLRP3 em macrófagos e células mononucleares do sangue periférico. Essa associação também tem sido identificada como um fator determinante para a patogênese induzida por hemólise letal (38, 39, 143). Como o principal fator que indica a formação do inflamassomas envolve a ativação de caspase-1, investigamos a capacidade do nosso modelo de hemólise intravascular aguda em induzir a atividade da caspase-1 em leucócitos circulantes. Os nossos resultados mostram que os neutrófilos e monócitos aprestam uma capacidade temporal em ativar caspase-1, e destacam uma dinâmica diferencial entre essas células nos estágios iniciais da resposta inflamatória induzida pela hemólise. Surpreendentemente, os neutrófilos, conhecidos por sua rápida mobilização e resposta imune eficaz (144), não apresentaram um aumento significativo na ativação da caspase-1 nos primeiros 15 minutos após a indução da hemólise intravascular aguda. Esse dado, em conjunto com as análises de intravital, podem sugerir que, nos primeiros 15 minutos após a hemólise intravascular, os neutrófilos estejam imediatamente mais funcionais para a adesão (99, 145, 146) do que para o processamento de IL-1 $\beta$  (147). Por outro lado, os monócitos, imediatamente apresentaram um aumento significativo de caspase-1 ativada, sugerindo um papel proeminente dessas células nas vias inflamatórias, incluindo o processamento de citocinas (148), particularmente de IL-1β, para ativação parácrina celular em resposta à hemólise. Isso demostra que em uma resposta imediata ao estresse hemolítico, os neutrófilos e monócitos podem atuar em regulação temporal das suas funções. Esse fato é ainda mais notável, quando após 1 hora da indução da hemólise, tanto os neutrófilos quanto os monócitos apresentam um aumento significativo na ativação da caspase-1, sugerindo que ambas as células estão envolvidas ativamente no processamento de IL-1ß nesse estágio mais estendido da resposta inflamatória (149).

Com o objetivo de investigar a possível relação entre a ativação de caspase-1 e formação do inflamassoma NLRP3 na resposta inflamatória induza pela hemólise intravascular aguda, optamos por realizar a inibição farmacológica utilizando a molécula MCC950, um potente inibidor específico do inflamassoma NLRP3 (150). Esta molécula, que não interfere no *priming* do inflamassoma tem demostrado eficácia *in vivo* e *in vitro*, em diversas espécies, e modelos de doenças, reduzindo a fibrose, hipertrofia tecidual e inflamação (39, 151-154). Como esperado, a inibição do inflamassoma NLRP3 resultou em uma significativa diminuição da atividade de caspase-1, tanto em neutrófilos quanto em monócitos dos animais, comprovando que nos processos hemolíticos *in vivo*, o inflamassoma NLRP3 ocorre, não somente em monócitos, mas também nos neutrófilos, impulsionando a ativação de caspase-1, e possivelmente contribuindo para a liberação de IL-1β observada *in vivo*.

A formação do inflamassoma NLRP3 é reconhecida como um fator chave nos processos patogênicos associados à isquemia e reperfusão, e dada a observação de que a hemólise intravascular aguda resulta em processos semelhantes a vaso-oclusão na AF (155, 156), realizamos uma investigação para compreender o papel desse inflamassoma nas alterações microvasculares decorrentes da hemólise aguda. Notavelmente, nossos resultados

mostraram que a inibição do inflamassoma NLRP3 antecipadamente à hemólise intravascular aguda, preserva a velocidade das células sanguíneas e da perfusão da microcirculação, evidenciando a formação desse inflamassoma e sua participação nos processos de recrutamento de leucócitos em resposta ao estímulo hemolítico agudo. A validação dessa hipótese foi corroborada pela análise de intravital, que revelou uma redução significativa na adesão de leucócitos à parede vascular induzida pela hemólise durante a inibição deste inflamassoma. Curiosamente, não detectamos impactos nos processos de rolamento ou extravasamento de leucócitos, sugerindo que a formação de NLRP3 pode ter papel específico para processo de adesão dos leucócitos ao endotélio microvascular.

Dados da literatura podem apoiar a hipótese de que este efeito pode ser decorrente da indução da expressão de moléculas de adesão em leucócitos. Isso porque estudos prévios demostraram que a expressão e atividade da integrina CD11b em neutrófilos e monócitos desempenham um papel significativo nas interações leucócito-endotélio em desordens hemolíticas (129, 157, 158). Da mesma forma, a ativação de NLRP3 já foi correlacionada à regulação da expressão de CD11b (159). Uma vez que o aumento da expressão dessa integrina foi constatado em nossos resultados, é possível deduzir que a formação do inflamassoma NLRP3 em neutrófilos e monócitos durante a hemólise intravascular aguda pode desencadear um processo inflamatório e oclusão vascular, mediado pela expressão de integrinas, notadamente a CD11b. Entretanto, é importante ressaltar que as nossas análises se limitaram a apenas a expressão de CD11b, e não a sua forma ativada, e de camundongos sem tratamento, e, portanto, para essa confirmação seria necessário a análise desta integrina em seu estado ativado e sob a inibição de NLRP3.

Uma vez reconhecidos os efeitos da inibição do inflamassoma NLRP3 nos processos de adesão de leucócitos e inflamação vascular induzidos pela hemólise aguda, buscamos avaliar se esse efeito poderia ser mediado pela liberação de IL-1 $\beta$ . Anteriormente, estudos indicaram que a neutralização de IL-1 $\beta$  e IL-18 reduz a adesão e extravasamento de leucócitos, especialmente em condições induzidas por TNF- $\alpha$  em animais com anemia falciforme (160, 161). Surpreendentemente, a inibição do inflamassoma NLRP3 com MCC950 não resultou em alterações significativas nos níveis de IL-1 $\beta$ , um contraste com estudos anteriores que demonstraram anulação do processamento de IL-1 $\beta$  em camundongos *knockout NLRP3*<sup>-/-</sup> (38, 162). Além disso, em nossos resultados identificamos que os níveis plasmáticos de TNF- $\alpha$ , que normalmente age sinergicamente na liberação de IL-1 $\beta$  (63, 163) também não

foram modificados pela inibição do inflamassoma NLRP3 *in vivo* em nosso modelo de hemólise intravascular aguda.

Conforme amplamente conhecido, os inflamassomas permitem uma regulação adicional da ativação de caspase-1 ao facilitar a interação de pró-caspase-1 com specks (ou aglomerados) de ASC (56), Assim é esperado que a inibição da oligomerizacao de inflamassomas culmine na redução de caspase-1 ativada. No entanto, dado que a dimerização da pró-casapse-1 é necessária para alcançar a ativação autolítica e a montagem dos tetrâmeros da caspase-1 madura, presume-se que essa formação de dímeros também possa ocorrer apenas pela presença de aglomerados de ASC ou filamentos de domínios CARD (164). Essa observação torna-se relevante para a compreensão de nossos resultados, uma vez que notamos um efeito parcial da inibição do inflamassoma NLRP3 nos processos inflamatórios induzidos pela hemólise intravascular, o que propõe a colocação da caspase-1 como mediador principal desta resposta inflamatória. Assim, procuramos avaliar se a ativação de caspase-1, independentemente da formação de inflamassoma NLRP3, poderia contribuir de maneira significativa para essas alterações. Por esse motivo, optamos por inibir especificamente a atividade de caspase-1 usando o YVAD, previamente demostrado atenuar os processos inflamatórios agudos e em tecidos reduzindo a apoptose e a liberação TNF-α, IL-6, IL-1β e IL-18 (165-168). A eficácia dessa abordagem foi confirmada pela redução significativa na frequência de neutrófilos e monócitos com caspase-1 ativada durante a hemólise intravascular aguda, como também observado anteriormente quando os animais foram tratados com MCC950.

De forma surpreendente, a inibição especifica da atividade de caspase-1 foi mais eficiente do que a inibição do inflamassoma NLRP3 em prevenir as alterações microvasculares induzidas pela hemólise aguda. Isso porque o tratamento com YVAD antes do estímulo hemolítico agudo, reduziu significativamente o comprometimento da velocidade das células sanguíneas em resposta à hemólise intravascular. Isso resultou na prevenção de processos de baixa perfusão na microvasculatura tecidual. Além disso, análises de microscopia intravital revelaram que a inibição da atividade de caspase-1 reduziu não apenas o número de leucócitos aderidos, mas também o rolamento desses leucócitos. Isso sugere que a ativação da caspase-1, mas não necessariamente do inflamassoma NLRP3, é essencial para iniciar o processo de recrutamento de leucócitos, contribuindo para os processos de oclusão vascular que ocorre durante a hemólise intravascular. De modo relevante, os efeitos observados parecem ser independentes das citocinas IL-1 $\beta$  ou TNF- $\alpha$ , uma vez que a inibição de caspase-1 também não modulou a liberação dessas citocinas em neste modelo de hemólise.

Um fenômeno análogo na migração de leucócitos independente de tais citocinas foi observado por Hila Israelov e colaboradores (169), que demostraram que a inibição seletiva da caspase-1 *in vivo*, mas não a neutralização das IL-1β ou IL-18, resultou na redução da adesão e infiltração de células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) ao endotélio da barreira hematoencefálica. Embora os mecanismos subjacentes aos efeitos induzidos pela caspase-1 não estejam completamente elucidados, as evidências da literatura sugerem que a ativação dessa protease é essencial para a expressão de LFA-1 (CD11a) em leucócitos, assim como na expressão de moléculas de adesão e na internalização de proteínas de junção endotelial (169). Portanto é plausível inferir que a atividade caspase-1 está intrinsecamente ligada a outras quimiocinas diretamente envolvidas na ativação de leucócitos e de células endoteliais. Como a interação desses processos facilita o recrutamento e transmigração de leucócitos para o espaço vascular (170), isso possivelmente explica por que a inibição seletiva da caspase-1 em nossos dados resultou em uma melhoria significativa nos processos de rolamento e adesão de leucócitos e na prevenção da hipoperfusão causada pela hemólise intravascular aguda.

Entretanto, é importante destacar, que a presença de dados contraditórios observados em relação à dependência das citocinas IL-1 $\beta$  e IL-18 na adesão e migração de leucócitos em diferentes modelos de inflamação, mostram que o papel dessas citocinas pode variar em contextos específicos ou em condições patológicas distintas. Adicionalmente, ao observar que na hemólise intravascular a produção de IL-1 $\beta$  não é modulada durante a inibição de NLRP3 ou da caspase-1, sugere-se a existência de mecanismos adicionais independentes de inflamassomas ou desta protease em específico, envolvidos na maturação dessa citocina. Por exemplo outros estudos mostraram que as *Neutrophil Serine Proteases* (NSPs), como a PR3, também podem processar a pró-IL-1 $\beta$  em um fragmento bioativo, e atribuíram um papel a essas enzimas no processamento extracelular do pró-IL-1 $\beta$  liberado em ambientes inflamatórios (171-174). Ainda assim, reconhecemos que a falta de significância estatística na diferença entre os grupos estudos, ambos em tratamento com MCC950 ou YVAD, não permite uma conclusão assertiva da eficácia da inibição de NLRP3 ou caspase-1 sobre os mecanismos e fatores envolvidos na liberação de IL-1 $\beta$  ou de TNF- $\alpha$ .

Dada as possiblidades dos mecanismos que possam justificar a liberação destas citocinas, e considerando o sistema imune inato como uma rede complexa de interação

biológica (175), buscamos investigar a participação de outras células no processamento de citocinas em resposta aos estímulos hemolíticos, bem como suas contribuições para o recrutamento de leucócitos *in vivo*. Células endoteliais, posicionadas estrategicamente no revestimento dos vasos sanguíneos, ficam diretamente expostas aos produtos resultantes da hemólise, tornando-se potenciais fontes de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias (176). Diante disso, conduzimos um estudo *in vitro* para avaliar o potencial dessas células nos processos inflamatórios induzidos pela hemólise intravascular.

Em concordância com dados prévios, demonstramos que a exposição das células endoteliais HUVEC ao heme, principal produto derivado do processo hemolítico, resultou em uma expressão significativa de moléculas de adesão endotelial ICAM-1, VCAM-1 e E-selectina (30, 37, 41). Em complemento aos estudos existentes, demonstramos que a expressão dessas moléculas é influenciada pela concentração de heme, o que podem contribuir para a melhor compreensão dos processos de inflamação vascular in vivo em resposta à hemólise intravascular aguda. Tanto a ICAM-1, expressa constitutivamente pelas células endoteliais, quanto a Eselectina, regulada por transcrição (177), apresentaram aumento em suas expressões em doses intermediárias de heme. Esse fenômeno pode ser relevante para o rápido rolamento de leucócitos, especialmente neutrófilos, devido ao seu grande número circulante e à expressão de CD11/CD18 e PSGL1, ligantes de ICAM-1 e E-selectina, respectivamente (178). E de fato, o recrutamento de leucócitos induzido pela hemólise in vivo foi constatado ser dependente da atividade de E-selectina e ICAM-1 de células endoteliais (99). Por outro lado, para o aumento expressivo de VCAM-1 em resposta ao heme, foi necessária uma concentração elevada do composto. Sabe-se que a regulação de VCAM-1 em células endoteliais pode depender do tempo de exposição e da concentração dos estímulos. Além disso, a sua expressão, também regulada pelos fatores de transcrição NF-kB e AP-1, pode ser influenciada por azurocidina, liberada por neutrófilos ativados (177, 179). Esse fenômeno tem sido demonstrado in vivo como um fator importante para o recrutamento de monócitos ao endotélio ativado, os quais se ligam à VCAM-1 por meio da expressão da integrina  $\alpha 4\beta 1$  (VLA-4) (180). Assim, é possível que essa expressão diferenciada das moléculas de adesão endotelial induzidas por heme in vitro pode modular a dinâmica do recrutamento de leucócitos observados in vivo em nossos resultados.

Em consonância aos trabalhos anteriores, demostramos que as HUVECs, quando estimuladas com heme, liberam diversas moléculas pró-inflamatórias, incluindo IL-6, IL-8 e MCP1. Essas moléculas não apenas favorecem a quimiotaxia e extravasamento de monócitos e neutrófilos, mas também atuam como um mecanismo de retroalimentação positiva para a
expressão de moléculas de adesão, indicando claramente uma ativação dessas células em direção a um fenótipo pró-inflamatório (37, 41, 181-183). Paralelamente a isso, demonstramos que o heme exerce uma regulação positiva na produção e liberação da citocina pró-inflamatória IL-1 $\beta$  em HUVECs, por meio de um mecanismo associado à atividade da caspase-1. Embora não tenhamos especificamente confirmado o envolvimento do inflamassoma NLRP3 nesse processo, resultados anteriores sugerem que a ativação do inflamassoma NLRP3, mediada pelo heme e Hb em células endoteliais, resulta na liberação de IL-1 $\beta$  madura (162).

Além disso, nossos dados mostram que o heme possui a capacidade de induzir um rápido estado de priming nas HUVECs, o que pode resultar na produção de caspase-1 e das proteínas associadas ao inflamassoma, conforme indicado pela elevação dos níveis de RNAm de CASP1, PYCARD e NLRP3. Notavelmente, o aumento significativo do RNAm CASP1, mas não de NLRP3, sugere que, em 3 horas de exposição ao heme, as células endoteliais favorecem mais a produção de caspase-1 do que do inflamassoma NLRP3, possivelmente como um mecanismo de resposta rápida ao estímulo inflamatório. Esse favorecimento pode estar associado aos mecanismos de autoclivagem de Caspase-1, independentes do inflamassoma, representando uma resposta ágil das células endoteliais ao estímulo de heme, e que pode, potencialmente, estar relacionada à geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) (98, 184-186). De fato, dados preliminares deste estudo (Apêndice XIII - Figura 46) mostram que o uso do inibidor de caspase-1 YVAD, além de não interferir na atividade de caspase-1 induza por heme, também não modifica a ativação das células endoteliais. Esta relação poderia ser mais aprofundada neste estudo mediante uma análise adicional da produção de ROS e a aplicação de antioxidantes, bem como a avalição de inibidor de caspase-1 alternativo e a participação de caspases inflamatórias (187).

Outrossim, essa perspectiva ainda é reforçada pela constatação de que a indução do RNAm de *PYCARD*, fundamental para a síntese de ASC (molécula adaptadora de Caspase-1 para o inflamassoma NLRP3), não se mostrou significativa ao longo do período de 3 horas. Adicionalmente, a exposição das HUVECs ao heme por esse intervalo não foi suficiente para gerar um aumento significativo nos níveis de RNAm de *IL1B* e *IL18*. No entanto, ao comparar esses resultados com um estudo anterior que destacou a necessidade de uma incubação mais prolongada para observar aumento significativo de RNAm para *IL1B* e *NLRP3* (162), podemos inferir que a ativação desses dois genes em resposta ao heme pode ser um processo que requer um tempo mais extenso. Esses dados destacam um papel significativo da capase-1, tanto *in* 

*vitro*, quanto *in vivo*, nos processos inflamatórios agudos em resposta aos insultos da hemólise intravascular.

Uma descoberta inédita deste estudo revela que o heme também promove o aumento e a liberação de S100A8 em células endoteliais HUVECs, um fenômeno anteriormente observado pelo nosso grupo apenas em macrófagos humanos (39). De maneira substancial, destacamos que essa liberação ocorre em um período de tempo consideravelmente rápido de 3 horas. Considerando que a S100A8 é reconhecida como uma importante alarmina nos processos de inflamação estéril, desempenhando um papel na indução de angiogênese, proliferação e migração de células endoteliais microvasculares (188-190), a revelação de que o heme também induz a liberação dessa alarmina por células endoteliais fornece uma contribuição significativa para a compreensão da magnitude dos processos inflamatórios estéreis desencadeados pela hemólise intravascular aguda (191).

Dada a capacidade da S100A8 em induzir a ativação de diversos receptores do sistema imune inato em diferentes tipos celulares, resultando na liberação de IL-1ß e outras citocinas, buscamos avaliar, in vitro, o papel dessa alarmina na indução da atividade inflamatória das células endoteliais. Surpreendentemente, S100A8 não promoveu o aumento da expressão de moléculas de adesão endotelial. Além disso, observou-se uma tendência na liberação das citocinas pró-inflamatórias IL-6 e MCP1 em resposta ao S100A8, enquanto não houve aumento na liberação de IL-8. Estudos prévios, que também indicam efeitos contraditórios das proteínas S100A, atribuíram esses efeitos à diferentes formas do complexo S100A8/A9. Por exemplo, foi demostrado que o heterodímero S100A8/A9 é mais eficaz do que os homodímeros de S100A8 ou S100A9 em aumentar a expressão de IL-6, ICAM-1, VCAM-1 e MCP1 em células endoteliais pré-tratadas com produtos finais de glicação avançada (92, 192). Por outro lado, algumas pesquisas indicam que a citocina pró-inflamatória IL-6 é positivamente regulada por S100A8 e S100A9, mas não pelo heterodímero S100A8/A9 (193). Assim, dado que no sistema biológico S100A8 e S100A9 formam predominantemente heterodímeros, é possível que os efeitos atribuídos a essa alarmina nos nossos experimentos in vitro, influenciados pela composição do meio de nutrição celular (Apêndice XI e Apêndice XII), possam ter mecanismos dependentes ou independentes da formação de heterocomplexos, assim como pode ocorrer nos processos de hemólise in vivo, considerando-se, de mesma forma os fluídos biológicos.

Enquanto parte das nossas observações tenham sugerido uma atividade moderada da S100A8 na ativação dessas células endoteliais *in vitro*, ao mesmo tempo, surpreendentemente, a S100A8 demonstrou ser um estimulador potente na liberação de IL-1β, superando até mesmo o efeito induzido pelo heme. Em células como macrófagos e monócitos, a S100A8 e S100A9 são conhecidas por induzirem a liberação de IL-1β através da ativação da caspase-1 via Pyrin ou formação do inflamassoma NLRP3. Esse processamento de IL-1β por S100A foi demostrado ser dependente da presença de ROS, ou de um segundo sinal ativador, como ATP ou lipopolissacarídeo (LPS) (95, 194, 195). Entretanto, ao associarmos a liberação de IL-1β com a atividade de caspase-1 das HUVECs, observamos que a S100A8 não foi capaz de estimular a ativação da caspase-1 ou de amplificar o efeito de heme durante o período avaliado, e pelo contrário, houve uma inibição dessa atividade após 3 horas de incubação com essa alarmina.

Essa observação levanta duas possibilidades: a primeira é que a atividade da caspase-1 em resposta à S100A8 pode ocorrer antecipadamente ao tempo analisado, evidenciando a necessidade de análises complementares em diferentes momentos. A segunda possibilidade, apoiada por estudos em macrófagos (39), é que a S100A8 atua como um sinal inicial para o processamento de IL-1β, agindo como um "*priming*" nas células endoteliais. Para validar esta hipótese, analisamos as expressões gênicas das principais proteínas associadas à caspase-1 e à maturação de IL-1β. Apesar dos dados indicarem um aumento na expressão do RNAm de *IL18*, citocina igualmente processada por caspase-1, a S100A8 não induziu a transcrição dos genes *IL1B* ou *NLRP3* nas HUVECs. De maneira expressiva, a S100A8 estimulou significativamente a transcrição do RNAm de *CASP1*, com uma tendência de elevação de *PYCARD*. Esses dados evidenciam que a S100A8, apesar de não induzir diretamente a atividade da caspase-1 no período de 3 horas, atua como um "*priming*" das células endoteliais, estimulando a produção dessa protease para amplificar a maturação de IL-1β por um segundo estímulo.

Neste trabalho observamos um aspecto importante no mecanismo de liberação de IL-1 $\beta$  pelas células endoteliais em resposta a S100A8 e heme, que pode ser relevante nos processos inflamatórios induzidos pela hemólise intravascular aguda. Ao mostrarmos que sob a presença de ambos os estímulos, os níveis de IL-1 $\beta$  aumentam, sem, no entanto, alterar a frequência de HUVECs com caspase-1 ativada, corroboramos que S100A8 inicia ou prepara a maquinaria celular para a ativação subsequente da caspase-1 por heme, que atua como um segundo sinal. Adicionado a isto, heme por sua vez, sinergia com S100A8 potencializando a

transcrição do gene *CASP1*, amplificando ainda mais a liberação de IL-1 $\beta$  pelas células endoteliais. Além disso, a S100A8 parece potencializar os efeitos do heme no processo de inflamação vascular de maneira dependente de caspase-1. Isso ocorre porque, ao promover a maturação de IL-1 $\beta$ , a caspase-1 contribui para a liberação de IL-8 e MCP-1 (196-198), podendo contribuir para a ativação e quimiotaxia de leucócitos durante eventos de hemólise *in vivo*.

Finalmente, nossa busca visou avaliar os impactos da indução da hemólise intravascular crônica nos processos inflamatórios, com foco especial na atividade de caspase-1 e na possível participação do inflamassoma NLRP3. De acordo com os achados anteriores de Gotardo e colaboradores (100), constatamos que a hemólise intravascular crônica resulta em uma redução consistente e significativa de Hx, associada não apenas à liberação de IL-1 $\beta$ , mas também de IL-18. No decorrer deste estudo, observamos um aumento na presença de neutrófilos e monócitos com caspase-1 ativa neste modelo de hemólise, indicando uma atividade pró-inflamatória dessas células. É relevante ressaltar que, de maneira semelhante aos animais submetidos a hemólise aguda, foi previamente relatado que este modelo de hemólise crônica induz leucocitose, correlacionada com a liberação de ICAM-1 e endotelina, sugerindo um estado de inflamação vascular (100).

Durante a inflamação vascular, os macrófagos desempenham um papel essencial na transição da fase aguda para a fase crônica, contribuindo para a angiogênese e remodelação tecidual (199). No ambiente hepático, essas células assumem uma função fundamental na resposta inflamatória associada à hemólise intravascular e extravascular, que devido a sua localização e presença de receptores participam do reconhecimento de DAMPs, eritroeferocitose e do catabolismo do heme (109). De maneira significativa, demonstramos que no figado, o processo recorrente de hemólise intravascular induz um aumento das células com fenótipo F4/80<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>, frequentemente identificadas como subpopulações de macrófagos produtores de citocinas (200, 201). Importante observar que os macrófagos monocíticos Ly6C<sup>high</sup> (MoMøs), monócitos recém-infiltrados durante o processo inflamatório, expressam altos níveis de CD11b, estabelecendo-se em fenótipo (202) e a uma frequência semelhante a subpopulação de macrófagos residentes (células de Kupffer - KC) (203, 204). Curiosamente, esta frequência se assemelhou às células F4/80<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup> encontradas em nossos dados. Assim, a paridade na frequência de MoMøs e o subfenótipo KC destacado na literatura, somado com os nossos resultados, pode sugerir que a hemólise intravascular crônica resulta na possível diferenciação, ou contribuição de células recém-infiltradas, para os macrófagos residentes. Entretanto, é importante reconhecer uma limitação do nosso estudo; a complexidade do fenótipo das KC (110, 204-207) e a ausência do marcador Ly6C, dificultam a conclusão definitiva sobre a origem da população F4/80<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup> em resposta ao estresse hemolítico crônico.

Neste estudo demostramos que na fase aguda da inflamação vascular, a atividade da caspase-1 está associada à hipoperfusão microvascular, evidenciando a contribuição da caspase-1 para os eventos isquêmicos observados na resposta imediata à hemólise. Por outro lado, na hemólise crônica, a identificação do aumento nas células hepáticas com fenótipo F4/80<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup> com caspase-1 ativada revela uma possível relação entre essas células o seu fenótipo pró-inflamatório (208), e sugere uma resposta contínua, e potencialmente contribuindo para a persistência da inflamação e para os desdobramentos fisiopatológicos associados à hemólise crônica. Este estudo ainda destaca uma heterogeneidade funcional dentro da população de macrófagos KC, uma vez que a subpopulação KC1 (CD206-) se destaca como mais responsiva ou suscetível à ativação da caspase-1 durante a hemólise crônica, contribuindo assim para o ambiente inflamatório no fígado. Por outro lado, a contribuição da KC2 (CD206<sup>+</sup>), conhecidas por seu envolvimento no remodelamento tecidual e no metabolismo hepático, podem desempenhar suas funções na tentativa de adaptação às demandas metabólicas e aos desafios do ambiente inflamatório crônico (110, 206). Essa associação fortalece a compreensão dos mecanismos subjacentes à patogênese hepática em contextos como a hemólise crônica, onde a ativação da caspase-1 em KCs parece desempenhar um papel significativo nos processos de inflamação e favorecendo a lesão tecidual.

A participação das KCs na atividade celular tem se mostrado um fator contribuinte importante para a lesão hepática promovida pela ativação de inflamassomas induzidos por ROS, HMGB1 e histonas, desencadeando o processamento de IL-1β por estas células (209-211). A formação do inflamassoma no tecido hepático encontrada em nossos dados corrobora que os macrófagos nesse ambiente desempenham um papel essencial na resposta inflamatória crônica, ativando vias intracelulares complexas em resposta ao estresse hemolítico contínuo. A evidência da redução nas formas precursoras de IL-1β e caspase-1, juntamente com a formação do inflamassoma no tecido hepático durante a hemólise crônica, podem indicar uma rápida ativação e processamento dessas moléculas (149) em resposta à condição hemolítica persistente. Importante notar que, embora os níveis de IL-1β solúvel no figado permaneçam inalterados, há um aumento em sua circulação. Portanto, em conjunto, esses dados apontam para a participação deste órgão, presumivelmente dos macrófagos presentes no tecido hepático,

nos eventos sistêmicos associados à inflamação crônica desencadeada por episódios hemolíticos recorrentes.

Em síntese, esse estudo fornece novas perspectivas para a compreensão dos complexos mecanismos que envolvem a resposta imune inata e suas imediatas implicações na inflamação vascular desencadeada por processos hemolíticos. Evidenciamos uma função central da caspase-1 no recrutamento de leucócitos em resposta a hemólise intravascular e uma putativa participação do endotélio no processamento e liberação de Il-1 $\beta$  e da alarmina S100A8, que atua estimulando a produção de caspase-1 e amplificando a resposta inflamatória estéril e vascular (Figura 36). Assim, sugere-se que o direcionamento da ativação da caspase-1 e suas vias associadas podem representar uma potencial intervenção terapêutica para atenuar os efeitos inflamatórios e microvasculares adversos da hemólise intravascular, um mecanismo patológico que ocorre em doenças graves, como nas reações transfusionais e na anemia falciforme.



Figura 36. **Contribuição do inflamassoma NLRP3 e da atividade de caspase-1 nos processos de inflamação vascular em resposta à hemólise intravascular.** A ruptura das hemácias resulta na liberação imediata de hemoglobina (Hb) e heme no espaço intravascular. O heme extracelular induz a ativação de células endoteliais (EC) e a liberação de S100A8 endotelial. A alarmina S100A8, que também pode ser liberada por leucócitos ativados, prepara a EC (priming de CASP1 e PYCARD) para a ativação de caspase-1 por heme. Esse processo amplifica a liberação de IL-1β das ECs, potencializando a inflamação vascular. A formação do inflamassoma NLRP3 contribui para a adesão de leucócitos ao endotélio ativado. A ativação de caspase-1 de neutrófilos (Neut.) e monócitos (Monoc.) potencializa o recrutamento de leucócitos na microvasculatura, induzindo o rolamento e ativação dessas células, resultando na redução da velocidade das células e comprometendo a perfusão sanguínea tecidual. Durante a hemólise crônica, a formação do inflamassoma NLRP3 no tecido hepático e atividade de caspase-1 em células de Kupffer (KC) no figado, e de neutrófilos e monócitos no sangue periférico contribuem para a liberação sistêmica de IL-1β e IL-18. Figura da autora. Criada com BioRender.com.

### 7 CONCLUSÕES

- A hemólise intravascular estéril aguda resulta em uma rápida resposta inflamatória, caracterizada pela liberação da alarmina S100A8 e de IL-1β e IL-18, citocinas processadas em inflamassomas.
- Enquanto a ativação de caspase-1 em neutrófilos e monócitos, induzida pela hemólise intravascular, exerce um papel mais proeminente nos processos para o recrutamento de leucócitos na microvasculatura, levando a uma acentuada hipoperfusão tecidual, a formação do inflamassoma NLRP3 está associado principalmente ao processo de adesão.
- As células endoteliais, na presença de heme, secretam a alarmina S100A8, que por sua vez amplifica a indução de CASP1 e potencializa o processamento de IL-1β pelo endotélio.
- Processos recorrentes de hemólise intravascular estéril induz a continua atividade de caspase-1 de neutrófilos e monócitos circulantes, e de macrófagos do tecido hepático.
- A formação do inflamassoma NLRP3 nos tecidos e a atividade de caspase-1 em macrófagos contribuem para processamento tecidual e liberação sistêmica de IL-1β.
- A modulação da atividade de caspase-1 e do inflamassoma NLRP3 mostram-se como uma potencial abordagem terapêutica para atenuar as implicações da inflamação vascular, e possíveis danos orgânicos, se que sucedem das doenças hemolíticas.

### 8 REFERÊNCIAS

1. Guillaud C, Loustau V, Michel M. Hemolytic anemia in adults: main causes and diagnostic procedures. Expert Rev Hematol. 2012;5(2):229-41.

2. Dhaliwal G, Cornett PA, Tierney LM, Jr. Hemolytic anemia. Am Fam Physician. 2004;69(11):2599-606.

3. Beck N. Anemia: General Considerations. Diagnostic Hematology. London: Springer; 2014. p. 199-218.

4. Conran N. Intravascular hemolysis: a disease mechanism not to be ignored. Acta Haematol. 2014;132(1):97-9.

5. Costa FFF, K. M. Conran, N. Síndrome hemolítica. Fisiopatologia e clínica - classificação. In: Zago MAF, R. P.; Pasquini, R. , editor. Tratado de hematologia. São Paulo: Atheneu; 2013. p. 161-7.

6. Mendonca R, Silveira AA, Conran N. Red cell DAMPs and inflammation. Inflamm Res. 2016;65(9):665-78.

7. Kato GJ, Piel FB, Reid CD, Gaston MH, Ohene-Frempong K, Krishnamurti L, et al. Sickle cell disease. Nat Rev Dis Primers. 2018;4:18010.

8. Perrotta S, Gallagher PG, Mohandas N. Hereditary spherocytosis. Lancet. 2008;372(9647):1411-26.

9. Padmore R. Possible mechanisms for intravenous immunoglobulin-associated hemolysis: clues obtained from review of clinical case reports. Transfusion. 2015;55 Suppl 2:S59-64.

10. Da Costa L, Galimand J, Fenneteau O, Mohandas N. Hereditary spherocytosis, elliptocytosis, and other red cell membrane disorders. Blood Rev. 2013;27(4):167-78.

11. Członkowska A, Litwin T, Dusek P, Ferenci P, Lutsenko S, Medici V, et al. Wilson disease. Nature Reviews Disease Primers. 2018;4(1):21.

12. Master. PRJHARSR. Hemolytic Transfusion Reaction

: StatPearls Publishing LLC.; 2023.

13. Abildgaard U, Heimdal K. Pathogenesis of the syndrome of hemolysis, elevated liver enzymes, and low platelet count (HELLP): a review. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol. 2013;166(2):117-23.

14. Nagy E, Eaton JW, Jeney V, Soares MP, Varga Z, Galajda Z, et al. Red cells, hemoglobin, heme, iron, and atherogenesis. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2010;30(7):1347-53.

15. Rother RP, Bell L, Hillmen P, Gladwin MT. The clinical sequelae of intravascular hemolysis and extracellular plasma hemoglobin: a novel mechanism of human disease. JAMA. 2005;293(13):1653-62.

16. Kato GJ, Hsieh M, Machado R, Taylor Jt, Little J, Butman JA, et al. Cerebrovascular disease associated with sickle cell pulmonary hypertension. Am J Hematol. 2006;81(7):503-10.

17. Hill A, Richards SJ, Hillmen P. Recent developments in the understanding and management of paroxysmal nocturnal haemoglobinuria. Br J Haematol. 2007;137(3):181-92.

18. Ataga KI, Moore CG, Jones S, Olajide O, Strayhorn D, Hinderliter A, et al. Pulmonary hypertension in patients with sickle cell disease: a longitudinal study. Br J Haematol. 2006;134(1):109-15.

19. Andrieu V, Dumonceau O, Grange MJ. Priapism in a patient with unstable hemoglobin: hemoglobin Koln. Am J Hematol. 2003;74(1):73-4.

20. Taher A, Abou-Mourad Y, Abchee A, Zalouaa P, Shamseddine A. Pulmonary thromboembolism in beta-thalassemia intermedia: are we aware of this complication? Hemoglobin. 2002;26(2):107-12.

21. Conran N, Belcher JD. Inflammation in sickle cell disease. Clin Hemorheol Microcirc. 2018;68(2-3):263-99.

22. Schaer DJ, Buehler PW, Alayash AI, Belcher JD, Vercellotti GM. Hemolysis and free hemoglobin revisited: exploring hemoglobin and hemin scavengers as a novel class of therapeutic proteins. Blood. 2013;121(8):1276-84.

23. Lee FS. Genetic causes of erythrocytosis and the oxygen-sensing pathway. Blood Rev. 2008;22(6):321-32.

24. Schechter AN. Hemoglobin research and the origins of molecular medicine. Blood. 2008;112(10):3927-38.

25. Jorge SEea. Hemoglobin: strutucture, syntesis and oxygen transport

. In: Costa FFC, N., editor. Sickle cell anemia: Springer; 2016. p. 1-22.

26. Kato GJ. Haptoglobin halts hemoglobin's havoc. J Clin Invest. 2009;119(8):2140-2.

27. Schaer DJ, Alayash AI, Buehler PW. Gating the radical hemoglobin to macrophages: the antiinflammatory role of CD163, a scavenger receptor. Antioxid Redox Signal. 2007;9(7):991-9.

28. Kato GJ, Taylor JGt. Pleiotropic effects of intravascular haemolysis on vascular homeostasis. Br J Haematol. 2010;148(5):690-701.

29. Allali S, Rignault-Bricard R, de Montalembert M, Taylor M, Bouceba T, Hermine O, et al. HbS promotes TLR4-mediated monocyte activation and proinflammatory cytokine production in sickle cell disease. Blood. 2022;140(18):1972-82.

30. Belcher JD, Beckman JD, Balla G, Balla J, Vercellotti G. Heme degradation and vascular injury. Antioxid Redox Signal. 2010;12(2):233-48.

31. Quaye IK. Extracellular hemoglobin: the case of a friend turned foe. Front Physiol. 2015;6:96.

32. Roumenina LT, Rayes J, Lacroix-Desmazes S, Dimitrov JD. Heme: Modulator of Plasma Systems in Hemolytic Diseases. Trends Mol Med. 2016;22(3):200-13.

33. Dutra FF, Bozza MT. Heme on innate immunity and inflammation. Front Pharmacol. 2014;5:115.

34. Schmitt TH, Frezzatti WA, Jr., Schreier S. Hemin-induced lipid membrane disorder and increased permeability: a molecular model for the mechanism of cell lysis. Arch Biochem Biophys. 1993;307(1):96-103.

35. Balla G, Jacob HS, Eaton JW, Belcher JD, Vercellotti GM. Hemin: a possible physiological mediator of low density lipoprotein oxidation and endothelial injury. Arterioscler Thromb. 1991;11(6):1700-11.

36. Jeney V, Balla J, Yachie A, Varga Z, Vercellotti GM, Eaton JW, et al. Pro-oxidant and cytotoxic effects of circulating heme. Blood. 2002;100(3):879-87.

37. Belcher JD, Chen C, Nguyen J, Milbauer L, Abdulla F, Alayash AI, et al. Heme triggers TLR4 signaling leading to endothelial cell activation and vaso-occlusion in murine sickle cell disease. Blood. 2014;123(3):377-90.

38. Dutra FF, Alves LS, Rodrigues D, Fernandez PL, de Oliveira RB, Golenbock DT, et al. Hemolysis-induced lethality involves inflammasome activation by heme. Proc Natl Acad Sci U S A. 2014;111(39):E4110-8.

39. Silveira AAA, Mahon OR, Cunningham CC, Corr EM, Mendonca R, Saad STO, et al. S100A8 acts as an autocrine priming signal for heme-induced human Mvarphi pro-inflammatory responses in hemolytic inflammation. J Leukoc Biol. 2019.

40. Graca-Souza AV, Arruda MA, de Freitas MS, Barja-Fidalgo C, Oliveira PL. Neutrophil activation by heme: implications for inflammatory processes. Blood. 2002;99(11):4160-5.

41. Wagener FA, Feldman E, de Witte T, Abraham NG. Heme induces the expression of adhesion molecules ICAM-1, VCAM-1, and E selectin in vascular endothelial cells. Proc Soc Exp Biol Med. 1997;216(3):456-63.

42. Porto BN, Alves LS, Fernandez PL, Dutra TP, Figueiredo RT, Graca-Souza AV, et al. Heme induces neutrophil migration and reactive oxygen species generation through signaling pathways characteristic of chemotactic receptors. J Biol Chem. 2007;282(33):24430-6.

43. Lee MS, Kim YJ. Pattern-recognition receptor signaling initiated from extracellular, membrane, and cytoplasmic space. Mol Cells. 2007;23(1):1-10.

44. Schaefer L. Complexity of danger: the diverse nature of damage-associated molecular patterns. J Biol Chem. 2014;289(51):35237-45.

45. Jin HS, Suh HW, Kim SJ, Jo EK. Mitochondrial Control of Innate Immunity and Inflammation. Immune Netw. 2017;17(2):77-88.

46. Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. Pathogen recognition and innate immunity. Cell. 2006;124(4):783-801.

47. Farrugia M, Baron B. The Role of Toll-Like Receptors in Autoimmune Diseases through Failure of the Self-Recognition Mechanism. Int J Inflam. 2017;2017:8391230.

48. Akira S, Takeda K. Toll-like receptor signalling. Nat Rev Immunol. 2004;4(7):499-511.

49. Liu T, Zhang L, Joo D, Sun SC. NF-kappaB signaling in inflammation. Signal Transduct Target Ther. 2017;2.

50. Chen G, Shaw MH, Kim YG, Nunez G. NOD-like receptors: role in innate immunity and inflammatory disease. Annu Rev Pathol. 2009;4:365-98.

51. Kufer TA, Fritz JH, Philpott DJ. NACHT-LRR proteins (NLRs) in bacterial infection and immunity. Trends Microbiol. 2005;13(8):381-8.

52. Alcocer-Gomez E, Castejon-Vega B, Lopez-Sanchez M, Cordero MD. Inflammasomes in Clinical Practice: A Brief Introduction. Exp Suppl. 2018;108:1-8.

53. Coutermarsh-Ott S, Eden K, Allen IC. Beyond the inflammasome: regulatory NOD-like receptor modulation of the host immune response following virus exposure. J Gen Virol. 2016;97(4):825-38.

54. Lamkanfi M, Dixit VM. Inflammasomes: guardians of cytosolic sanctity. Immunol Rev. 2009;227(1):95-105.

55. Santoni G, Cardinali C, Morelli MB, Santoni M, Nabissi M, Amantini C. Danger- and pathogenassociated molecular patterns recognition by pattern-recognition receptors and ion channels of the transient receptor potential family triggers the inflammasome activation in immune cells and sensory neurons. J Neuroinflammation. 2015;12:21.

56. Broz P, Dixit VM. Inflammasomes: mechanism of assembly, regulation and signalling. Nat Rev Immunol. 2016;16(7):407-20.

57. Platnich JM, Muruve DA. NOD-like receptors and inflammasomes: A review of their canonical and non-canonical signaling pathways. Arch Biochem Biophys. 2019.

58. Kubes P, Mehal WZ. Sterile inflammation in the liver. Gastroenterology. 2012;143(5):1158-72.

59. Lamkanfi M, Dixit VM. Mechanisms and functions of inflammasomes. Cell. 2014;157(5):1013-22.

60. Elliott EI, Sutterwala FS. Initiation and perpetuation of NLRP3 inflammasome activation and assembly. Immunol Rev. 2015;265(1):35-52.

61. de Zoete MR, Palm NW, Zhu S, Flavell RA. Inflammasomes. Cold Spring Harb Perspect Biol. 2014;6(12):a016287.

62. Bauernfeind FG, Horvath G, Stutz A, Alnemri ES, MacDonald K, Speert D, et al. Cutting edge: NF-kappaB activating pattern recognition and cytokine receptors license NLRP3 inflammasome activation by regulating NLRP3 expression. J Immunol. 2009;183(2):787-91.

63. Franchi L, Eigenbrod T, Nunez G. Cutting edge: TNF-alpha mediates sensitization to ATP and silica via the NLRP3 inflammasome in the absence of microbial stimulation. J Immunol. 2009;183(2):792-6.

64. Rathinam VA, Fitzgerald KA. Inflammasome Complexes: Emerging Mechanisms and Effector Functions. Cell. 2016;165(4):792-800.

65. Lamkanfi M. Emerging inflammasome effector mechanisms. Nat Rev Immunol. 2011;11(3):213-20.

66. Mariathasan S, Monack DM. Inflammasome adaptors and sensors: intracellular regulators of infection and inflammation. Nat Rev Immunol. 2007;7(1):31-40.

67. Jimenez Fernandez D, Lamkanfi M. Inflammatory caspases: key regulators of inflammation and cell death. Biol Chem. 2015;396(3):193-203.

68. Gross O, Yazdi AS, Thomas CJ, Masin M, Heinz LX, Guarda G, et al. Inflammasome activators induce interleukin-1alpha secretion via distinct pathways with differential requirement for the protease function of caspase-1. Immunity. 2012;36(3):388-400.

69. Fettelschoss A, Kistowska M, LeibundGut-Landmann S, Beer HD, Johansen P, Senti G, et al. Inflammasome activation and IL-1beta target IL-1alpha for secretion as opposed to surface expression. Proc Natl Acad Sci U S A. 2011;108(44):18055-60.

70. Sun Q, Gao W, Loughran P, Shapiro R, Fan J, Billiar TR, et al. Caspase 1 activation is protective against hepatocyte cell death by up-regulating beclin 1 protein and mitochondrial autophagy in the setting of redox stress. J Biol Chem. 2013;288(22):15947-58.

71. Yazdi AS, Drexler SK, Tschopp J. The role of the inflammasome in nonmyeloid cells. J Clin Immunol. 2010;30(5):623-7.

72. Lewis JS, Lee JA, Underwood JC, Harris AL, Lewis CE. Macrophage responses to hypoxia: relevance to disease mechanisms. J Leukoc Biol. 1999;66(6):889-900.

73. Biason-Lauber A, Boni-Schnetzler M, Hubbard BP, Bouzakri K, Brunner A, Cavelti-Weder C, et al. Identification of a SIRT1 mutation in a family with type 1 diabetes. Cell Metab. 2013;17(3):448-55.

74. Rothmeier AS, Marchese P, Petrich BG, Furlan-Freguia C, Ginsberg MH, Ruggeri ZM, et al. Caspase-1-mediated pathway promotes generation of thromboinflammatory microparticles. J Clin Invest. 2015;125(4):1471-84.

75. Syed FM, Hahn HS, Odley A, Guo Y, Vallejo JG, Lynch RA, et al. Proapoptotic effects of caspase-1/interleukin-converting enzyme dominate in myocardial ischemia. Circ Res. 2005;96(10):1103-9.

76. Zhang WH, Wang X, Narayanan M, Zhang Y, Huo C, Reed JC, et al. Fundamental role of the Rip2/caspase-1 pathway in hypoxia and ischemia-induced neuronal cell death. Proc Natl Acad Sci U S A. 2003;100(26):16012-7.

77. Bergsbaken T, Fink SL, den Hartigh AB, Loomis WP, Cookson BT. Coordinated host responses during pyroptosis: caspase-1-dependent lysosome exocytosis and inflammatory cytokine maturation. J Immunol. 2011;187(5):2748-54.

78. Amer A, Franchi L, Kanneganti TD, Body-Malapel M, Ozoren N, Brady G, et al. Regulation of Legionella phagosome maturation and infection through flagellin and host Ipaf. J Biol Chem. 2006;281(46):35217-23.

79. Weber A, Wasiliew P, Kracht M. Interleukin-1 (IL-1) pathway. Sci Signal. 2010;3(105):cm1.

80. Gabay C, Lamacchia C, Palmer G. IL-1 pathways in inflammation and human diseases. Nat Rev Rheumatol. 2010;6(4):232-41.

81. Yazdi AS, Ghoreschi K. The Interleukin-1 Family. Adv Exp Med Biol. 2016;941:21-9.

82. Sedimbi SK, Hagglof T, Karlsson MC. IL-18 in inflammatory and autoimmune disease. Cell Mol Life Sci. 2013;70(24):4795-808.

83. Dunne A, O'Neill LA. The interleukin-1 receptor/Toll-like receptor superfamily: signal transduction during inflammation and host defense. Sci STKE. 2003;2003(171):re3.

84. Bent R, Moll L, Grabbe S, Bros M. Interleukin-1 Beta-A Friend or Foe in Malignancies? Int J Mol Sci. 2018;19(8).

85. Dinarello CA. Interleukin-1 in the pathogenesis and treatment of inflammatory diseases. Blood. 2011;117(14):3720-32.

86. Dinarello CA. Biologic basis for interleukin-1 in disease. Blood. 1996;87(6):2095-147.

87. Dinarello CA. Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family. Annu Rev Immunol. 2009;27:519-50.

88. Fantuzzi G, Puren AJ, Harding MW, Livingston DJ, Dinarello CA. Interleukin-18 regulation of interferon gamma production and cell proliferation as shown in interleukin-1beta-converting enzyme (caspase-1)-deficient mice. Blood. 1998;91(6):2118-25.

89. Blom L, Poulsen LK. IL-1 family members IL-18 and IL-33 upregulate the inflammatory potential of differentiated human Th1 and Th2 cultures. J Immunol. 2012;189(9):4331-7.

90. Chung Y, Chang SH, Martinez GJ, Yang XO, Nurieva R, Kang HS, et al. Critical regulation of early Th17 cell differentiation by interleukin-1 signaling. Immunity. 2009;30(4):576-87.

91. Donato R. Intracellular and extracellular roles of S100 proteins. Microsc Res Tech. 2003;60(6):540-51.

92. Ehlermann P, Eggers K, Bierhaus A, Most P, Weichenhan D, Greten J, et al. Increased proinflammatory endothelial response to S100A8/A9 after preactivation through advanced glycation end products. Cardiovasc Diabetol. 2006;5:6.

93. Vogl T, Tenbrock K, Ludwig S, Leukert N, Ehrhardt C, van Zoelen MA, et al. Mrp8 and Mrp14 are endogenous activators of Toll-like receptor 4, promoting lethal, endotoxin-induced shock. Nat Med. 2007;13(9):1042-9.

94. Narumi K, Miyakawa R, Ueda R, Hashimoto H, Yamamoto Y, Yoshida T, et al. Proinflammatory Proteins S100A8/S100A9 Activate NK Cells via Interaction with RAGE. J Immunol. 2015;194(11):5539-48.

95. Simard JC, Cesaro A, Chapeton-Montes J, Tardif M, Antoine F, Girard D, et al. S100A8 and S100A9 induce cytokine expression and regulate the NLRP3 inflammasome via ROS-dependent activation of NF-kappaB(1.). PLoS One. 2013;8(8):e72138.

96. Silveira AAC, C.; Corr, E.; Ferreira-Jr., W. A.; Costa, F. F.; Almeida, C. B.; Conran, N.; Dunne, A. Heme induces NLRP3 inflammasome formation in primary human macrophages and may propagate hemolytic inflammatory processes by inducing s100a8 expression. Blood. 2016;128(22):1256.

97. Silveira AA. Investigação das prorpiedades pró-inflamatórias do TNF-alfa e do heme em leucócitos in vitro e in vivo. Campinas, SP: Universidade Estadual de Campinas; 2017.

98. Nyakundi BB, Toth A, Balogh E, Nagy B, Erdei J, Ryffel B, et al. Oxidized hemoglobin forms contribute to NLRP3 inflammasome-driven IL-1beta production upon intravascular hemolysis. Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis. 2019;1865(2):464-75.

99. Almeida CB, Souza LE, Leonardo FC, Costa FT, Werneck CC, Covas DT, et al. Acute hemolytic vascular inflammatory processes are prevented by nitric oxide replacement or a single dose of hydroxyurea. Blood. 2015;126(6):711-20.

100. Gotardo É MF, Brito PL, Gushiken LFS, Chweih H, Leonardo FC, Costa FF, et al. Molecular and cellular effects of in vivo chronic intravascular hemolysis and anti-inflammatory therapeutic approaches. Vascul Pharmacol. 2023;150:107176.

101. Fairbanks VF, Ziesmer SC, O'Brien PC. Methods for measuring plasma hemoglobin in micromolar concentration compared. Clinical chemistry. 1992;38(1):132-40.

102. Tanaka T, Narazaki M, Kishimoto T. IL-6 in inflammation, immunity, and disease. Cold Spring Harb Perspect Biol. 2014;6(10):a016295.

103. Asare K, Gee BE, Stiles JK, Wilson NO, Driss A, Quarshie A, et al. Plasma interleukin-1beta concentration is associated with stroke in sickle cell disease. Cytokine. 2010;49(1):39-44.

104. Kaneko N, Kurata M, Yamamoto T, Morikawa S, Masumoto J. The role of interleukin-1 in general pathology. Inflamm Regen. 2019;39:12.

105. Blevins HM, Xu Y, Biby S, Zhang S. The NLRP3 Inflammasome Pathway: A Review of Mechanisms and Inhibitors for the Treatment of Inflammatory Diseases. Front Aging Neurosci. 2022;14:879021.

106. Martinon F, Burns K, Tschopp J. The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL-beta. Mol Cell. 2002;10(2):417-26.

107. Ley K, Laudanna C, Cybulsky MI, Nourshargh S. Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. Nat Rev Immunol. 2007;7(9):678-89.

De Donatis M, Fercoq F, Carlin LM. Imaging Inflammation by Intravital Microscopy. In: Man F, Cleary SJ, editors. Imaging Inflammation. Cham: Springer International Publishing; 2023. p. 223-41.
Soares MP, Hamza I. Macrophages and Iron Metabolism. Immunity. 2016;44(3):492-504.

110. Blériot C, Barreby E, Dunsmore G, Ballaire R, Chakarov S, Ficht X, et al. A subset of Kupffer cells regulates metabolism through the expression of CD36. Immunity. 2021;54(9):2101-16.e6.

111. Kelley N, Jeltema D, Duan Y, He Y. The NLRP3 Inflammasome: An Overview of Mechanisms of Activation and Regulation. Int J Mol Sci. 2019;20(13).

112. Dimitrov JD, Roumenina LT, Perrella G, Rayes J. Basic Mechanisms of Hemolysis-Associated Thrombo-Inflammation and Immune Dysregulation. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology. 2023;43(8):1349-61.

113. Zhou L, Bao J, Ma J. Hemolytic Anemia and Reactive Thrombocytosis Associated With Cefoperazone/Sulbactam. Frontiers in Pharmacology. 2019;10.

114. Gladwin MT, Kanias T, Kim-Shapiro DB. Hemolysis and cell-free hemoglobin drive an intrinsic mechanism for human disease. J Clin Invest. 2012;122(4):1205-8.

115. Jentho E, Novakovic B, Ruiz-Moreno C, Kourtzelis I, Martins R, Chavakis T, et al. Heme induces innate immune memory. bioRxiv. 2019:2019.12.12.874578.

116. Vázquez-Carballo C, Herencia C, Guerrero-Hue M, García-Caballero C, Rayego-Mateos S, Morgado-Pascual JL, et al. Role of Toll-like receptor 4 in intravascular hemolysis-mediated injury. J Pathol. 2022;258(3):236-49.

117. Poillerat V, Gentinetta T, Leon J, Wassmer A, Edler M, Torset C, et al. Hemopexin as an Inhibitor of Hemolysis-Induced Complement Activation. Frontiers in Immunology. 2020;11.

118. Roumenina LT, Chadebech P, Bodivit G, Vieira-Martins P, Grunenwald A, Boudhabhay I, et al. Complement activation in sickle cell disease: Dependence on cell density, hemolysis and modulation by hydroxyurea therapy. American Journal of Hematology. 2020;95(5):456-64.

119. Chen G, Zhang D, Fuchs TA, Manwani D, Wagner DD, Frenette PS. Heme-induced neutrophil extracellular traps contribute to the pathogenesis of sickle cell disease. Blood. 2014;123(24):3818-27.

120. Lewis CV, Sellak H, Sawan MA, Joseph G, Darby TM, VanInsberghe D, et al. Intestinal barrier dysfunction in murine sickle cell disease is associated with small intestine neutrophilic inflammation, oxidative stress, and dysbiosis. FASEB Bioadv. 2023;5(5):199-210.

121. Ascenzi P, Bocedi A, Visca P, Altruda F, Tolosano E, Beringhelli T, et al. Hemoglobin and heme scavenging. IUBMB Life. 2005;57(11):749-59.

122. Deuel JW, Vallelian F, Schaer CA, Puglia M, Buehler PW, Schaer DJ. Different target specificities of haptoglobin and hemopexin define a sequential protection system against vascular hemoglobin toxicity. Free Radic Biol Med. 2015;89:931-43.

123. Smith A, McCulloh RJ. Hemopexin and haptoglobin: allies against heme toxicity from hemoglobin not contenders. Front Physiol. 2015;6:187.

124. Schaer DJ, Vinchi F, Ingoglia G, Tolosano E, Buehler PW. Haptoglobin, hemopexin, and related defense pathways-basic science, clinical perspectives, and drug development. Front Physiol. 2014;5:415.

125. MULLER-EBERHARD U, JAVID, J., LIEM,L. L., HANSTEIN, A., HANNA, M. Plasma Concentrations of Hemopexin, Haptoglobin and Heme in Patients with Various Hemolytic Diseases. Blood. 1968;32(5):811-5.

126. Tolosano E, Altruda F. Hemopexin: structure, function, and regulation. DNA Cell Biol. 2002;21(4):297-306.

127. Vinchi F, Tolosano E. Therapeutic approaches to limit hemolysis-driven endothelial dysfunction: scavenging free heme to preserve vasculature homeostasis. Oxidative medicine and cellular longevity. 2013;2013:396527.

128. Levy AP, Asleh R, Blum S, Levy NS, Miller-Lotan R, Kalet-Litman S, et al. Haptoglobin: basic and clinical aspects. Antioxid Redox Signal. 2010;12(2):293-304.

129. Miguel LI, Leonardo FC, Torres LS, Garcia F, Mendonça R, Ferreira WA, et al. Heme induces significant neutrophil adhesion in vitro via an NF $\kappa$ B and reactive oxygen species-dependent pathway. Molecular and Cellular Biochemistry. 2021.

130. Frimat M, Tabarin F, Dimitrov JD, Poitou C, Halbwachs-Mecarelli L, Fremeaux-Bacchi V, et al. Complement activation by heme as a secondary hit for atypical hemolytic uremic syndrome. Blood. 2013;122(2):282-92.

131. Gerogianni A, Dimitrov JD, Zarantonello A, Poillerat V, Chonat S, Sandholm K, et al. Heme Interferes With Complement Factor I-Dependent Regulation by Enhancing Alternative Pathway Activation. Front Immunol. 2022;13:901876.

132. Merle NS, Grunenwald A, Rajaratnam H, Gnemmi V, Frimat M, Figueres ML, et al. Intravascular hemolysis activates complement via cell-free heme and heme-loaded microvesicles. JCI Insight. 2018;3(12).

133. Conran N, Ferreira HH, Lorand-Metze I, Thomazzi SM, Antunes E, de Nucci G. Nitric oxide regulates human eosinophil adhesion mechanisms in vitro by changing integrin expression and activity on the eosinophil cell surface. Br J Pharmacol. 2001;134(3):632-8.

134. Almeida CB, Scheiermann C, Jang JE, Prophete C, Costa FF, Conran N, et al. Hydroxyurea and a cGMP-amplifying agent have immediate benefits on acute vaso-occlusive events in sickle cell disease mice. Blood. 2012;120(14):2879-88.

135. Conran N, Gambero A, Ferreira HHA, Antunes E, de Nucci G. Nitric oxide has a role in regulating VLA-4-integrin expression on the human neutrophil cell surface. Biochemical Pharmacology. 2003;66(1):43-50.

136. Turhan A, Weiss LA, Mohandas N, Coller BS, Frenette PS. Primary role for adherent leukocytes in sickle cell vascular occlusion: a new paradigm. Proc Natl Acad Sci U S A. 2002;99(5):3047-51.

137. Adhami F, Liao G, Morozov YM, Schloemer A, Schmithorst VJ, Lorenz JN, et al. Cerebral ischemia-hypoxia induces intravascular coagulation and autophagy. Am J Pathol. 2006;169(2):566-83.

138. Hebbel RP, Belcher JD, Vercellotti GM. The multifaceted role of ischemia/reperfusion in sickle cell anemia. J Clin Invest. 2020;130(3):1062-72.

139. Ansari J, Gavins FNE. Ischemia-Reperfusion Injury in Sickle Cell Disease: From Basics to Therapeutics. The American Journal of Pathology. 2019;189(4):706-18.

140. van Loo G, Bertrand MJM. Death by TNF: a road to inflammation. Nat Rev Immunol. 2023;23(5):289-303.

141. Sheikh S, Rahman M, Gale Z, Luu NT, Stone PC, Matharu NM, et al. Differing mechanisms of leukocyte recruitment and sensitivity to conditioning by shear stress for endothelial cells treated with tumour necrosis factor-alpha or interleukin-1beta. Br J Pharmacol. 2005;145(8):1052-61.

142. Hurst SM, Wilkinson TS, McLoughlin RM, Jones S, Horiuchi S, Yamamoto N, et al. Il-6 and its soluble receptor orchestrate a temporal switch in the pattern of leukocyte recruitment seen during acute inflammation. Immunity. 2001;14(6):705-14.

143. Pitanga TN, Santana SS, Zanette DL, Guarda CC, Santiago RP, Maffili VV, et al. Effect of lysed and non-lysed sickle red cells on the activation of NLRP3 inflammasome and LTB4 production by mononuclear cells. Inflammation Research. 2021;70(7):823-34.

144. Malech HL, Deleo FR, Quinn MT. The role of neutrophils in the immune system: an overview. Methods Mol Biol. 2014;1124:3-10.

145. Buscher K, Wang H, Zhang X, Striewski P, Wirth B, Saggu G, et al. Protection from septic peritonitis by rapid neutrophil recruitment through omental high endothelial venules. Nature Communications. 2016;7(1):10828.

146. Yam AO, Chtanova T. Imaging the neutrophil: Intravital microscopy provides a dynamic view of neutrophil functions in host immunity. Cellular Immunology. 2020;350:103898.

147. Chen KW, Monteleone M, Boucher D, Sollberger G, Ramnath D, Condon ND, et al. Noncanonical inflammasome signaling elicits gasdermin D-dependent neutrophil extracellular traps. Sci Immunol. 2018;3(26).

148. Shamaa OR, Mitra S, Gavrilin MA, Wewers MD. Monocyte Caspase-1 Is Released in a Stable, Active High Molecular Weight Complex Distinct from the Unstable Cell Lysate-Activated Caspase-1. PLoS One. 2015;10(11):e0142203.

149. Boucher D, Monteleone M, Coll RC, Chen KW, Ross CM, Teo JL, et al. Caspase-1 selfcleavage is an intrinsic mechanism to terminate inflammasome activity. J Exp Med. 2018;215(3):827-40.

150. Coll RC, Hill JR, Day CJ, Zamoshnikova A, Boucher D, Massey NL, et al. MCC950 directly targets the NLRP3 ATP-hydrolysis motif for inflammasome inhibition. Nature Chemical Biology. 2019;15(6):556-9.

151. Coll RC, Robertson AA, Chae JJ, Higgins SC, Munoz-Planillo R, Inserra MC, et al. A small-molecule inhibitor of the NLRP3 inflammasome for the treatment of inflammatory diseases. Nat Med. 2015;21(3):248-55.

152. Grant AJ, Yang N, Moore MJ, Lam YT, Michael PL, Chan AHP, et al. Selective NLRP3 Inflammasome Inhibitor MCC950 Suppresses Inflammation and Facilitates Healing in Vascular Materials. Advanced Science. 2023;10(20):2300521.

153. van Hout GP, Bosch L, Ellenbroek GH, de Haan JJ, van Solinge WW, Cooper MA, et al. The selective NLRP3-inflammasome inhibitor MCC950 reduces infarct size and preserves cardiac function in a pig model of myocardial infarction. Eur Heart J. 2017;38(11):828-36.

154. Primiano MJ, Lefker BA, Bowman MR, Bree AG, Hubeau C, Bonin PD, et al. Efficacy and Pharmacology of the NLRP3 Inflammasome Inhibitor CP-456,773 (CRID3) in Murine Models of Dermal and Pulmonary Inflammation. The Journal of Immunology. 2016;197(6):2421-33.

155. Vogel S, Kamimura S, Arora T, Smith ML, Almeida LEF, Combs CA, et al. NLRP3 inflammasome and bruton tyrosine kinase inhibition interferes with upregulated platelet aggregation and in vitro thrombus formation in sickle cell mice. Biochemical and Biophysical Research Communications. 2021;555:196-201.

156. Vogel S, Arora T, Wang X, Mendelsohn L, Nichols J, Allen D, et al. The platelet NLRP3 inflammasome is upregulated in sickle cell disease via HMGB1/TLR4 and Bruton tyrosine kinase. Blood Adv. 2018;2(20):2672-80.

157. Cahayani WA, Norahmawati E, Budiarti N, Fitri LE. Increased CD11b and Hypoxia-Inducible Factors-1alpha Expressions in the Lung Tissue and Surfactant Protein-D Levels in Serum Are Related with Acute Lung Injury in Severe Malaria of C57BL/6 Mice. Iran J Parasitol. 2016;11(3):303-15.

158. Ohbuchi A, Kono M, Kitagawa K, Takenokuchi M, Imoto S, Saigo K. Quantitative analysis of hemin-induced neutrophil extracellular trap formation and effects of hydrogen peroxide on this phenomenon. Biochem Biophys Rep. 2017;11:147-53.

159. Hou L, Qu X, Qiu X, Huang R, Zhao X, Wang Q. Integrin CD11b mediates locus coeruleus noradrenergic neurodegeneration in a mouse Parkinson's disease model. Journal of Neuroinflammation. 2020;17(1):148.

160. Kaul DK, Thangaswamy S, Suzuka SM, Fabry ME, Wanderer AA, Gram H. Anti-Interleukin-1β Antibody-Based Therapy Ameliorates Endothelial Activation and Inflammation in Sickle Mice. Blood. 2011;118(21):848-.

161. Torres LS, Gotardo EMF, Leonardo FC, Brito PL, Förster I, Kovarik J, et al. Neutralization of Inflammasome-Processed Cytokines Reduces Inflammatory Mechanisms and Leukocyte Recruitment in the Vasculature of TNF-α-Stimulated Sickle Cell Disease Mice. Blood. 2021;138(Supplement 1):856-

162. Erdei J, Toth A, Balogh E, Nyakundi BB, Banyai E, Ryffel B, et al. Induction of NLRP3 Inflammasome Activation by Heme in Human Endothelial Cells. Oxidative medicine and cellular longevity. 2018;2018:4310816.

163. Dinarello CA, Cannon JG, Wolff SM, Bernheim HA, Beutler B, Cerami A, et al. Tumor necrosis factor (cachectin) is an endogenous pyrogen and induces production of interleukin 1. J Exp Med. 1986;163(6):1433-50.

164. Ross C, Chan AH, von Pein JB, Maddugoda MP, Boucher D, Schroder K. Inflammatory Caspases: Toward a Unified Model for Caspase Activation by Inflammasomes. Annu Rev Immunol. 2022;40:249-69.

165. Lin X, Ye H, Siaw-Debrah F, Pan S, He Z, Ni H, et al. AC-YVAD-CMK Inhibits Pyroptosis and Improves Functional Outcome after Intracerebral Hemorrhage. Biomed Res Int. 2018;2018:3706047.

166. Chen W, Su G, Xu Y, Guo W, Bhansali R, Pan B, et al. Caspase-1 inhibition ameliorates murine acute graft versus host disease by modulating the Th1/Th17/Treg balance. Int Immunopharmacol. 2021;94:107503.

167. Wu DD, Pan PH, Liu B, Su XL, Zhang LM, Tan HY, et al. Inhibition of Alveolar Macrophage Pyroptosis Reduces Lipopolysaccharide-induced Acute Lung Injury in Mice. Chin Med J (Engl). 2015;128(19):2638-45.

168. Dhani S, Zhao Y, Zhivotovsky B. A long way to go: caspase inhibitors in clinical use. Cell Death Dis. 2021;12(10):949.

169. Israelov H, Ravid O, Atrakchi D, Rand D, Elhaik S, Bresler Y, et al. Caspase-1 has a critical role in blood-brain barrier injury and its inhibition contributes to multifaceted repair. Journal of Neuroinflammation. 2020;17(1):267.

170. Tanaka T. Leukocyte Adhesion Molecules. In: Ratcliffe MJH, editor. Encyclopedia of Immunobiology. Oxford: Academic Press; 2016. p. 505-11.

171. Netea MG, van de Veerdonk FL, van der Meer JW, Dinarello CA, Joosten LA. Inflammasomeindependent regulation of IL-1-family cytokines. Annu Rev Immunol. 2015;33:49-77.

172. Gabelloni ML, Sabbione F, Jancic C, Fuxman Bass J, Keitelman I, Iula L, et al. NADPH oxidase derived reactive oxygen species are involved in human neutrophil IL-1 $\beta$  secretion but not in inflammasome activation. Eur J Immunol. 2013;43(12):3324-35.

173. Iula L, Keitelman IA, Sabbione F, Fuentes F, Guzman M, Galletti JG, et al. Autophagy Mediates Interleukin-1β Secretion in Human Neutrophils. Front Immunol. 2018;9:269.

174. Keitelman IA, Shiromizu CM, Zgajnar NR, Danielián S, Jancic CC, Martí MA, et al. The interplay between serine proteases and caspase-1 regulates the autophagy-mediated secretion of Interleukin-1 beta in human neutrophils. Front Immunol. 2022;13:832306.

175. Gasteiger G, apos, Osualdo A, Schubert DA, Weber A, Bruscia EM, et al. Cellular Innate Immunity: An Old Game with New Players. Journal of Innate Immunity. 2016;9(2):111-25.

176. Mai J, Virtue A, Shen J, Wang H, Yang X-F. An evolving new paradigm: endothelial cells – conditional innate immune cells. Journal of Hematology & Oncology. 2013;6(1):61.

177. Granger DN SE. Leukocyte–Endothelial Cell Adhesion. Inflammation and the Microcirculation. San Rafael (CA): Morgan & Claypool Life Sciences; 2010.

178. Medrano-Bosch M, Simón-Codina B, Jiménez W, Edelman ER, Melgar-Lesmes P. Monocyteendothelial cell interactions in vascular and tissue remodeling. Front Immunol. 2023;14:1196033.

179. Prame Kumar K, Nicholls AJ, Wong CHY. Partners in crime: neutrophils and monocytes/macrophages in inflammation and disease. Cell and Tissue Research. 2018;371(3):551-65.

180. Shi C, Pamer EG. Monocyte recruitment during infection and inflammation. Nat Rev Immunol. 2011;11(11):762-74.

181. Dri E, Lampas E, Lazaros G, Lazarou E, Theofilis P, Tsioufis C, et al. Inflammatory Mediators of Endothelial Dysfunction. Life (Basel). 2023;13(6).

182. Fahey E, Doyle SL. IL-1 Family Cytokine Regulation of Vascular Permeability and Angiogenesis. Front Immunol. 2019;10:1426.

183. Zhang D, Frenette PS. Leukocytes in the Vaso-Occlusive Process. In: Costa FF, Conran N, editors. Sickle Cell Anemia: From Basic Science to Clinical Practice. Cham: Springer International Publishing; 2016. p. 91-107.

184. Kaushik DK, Gupta M, Kumawat KL, Basu A. NLRP3 inflammasome: key mediator of neuroinflammation in murine Japanese encephalitis. PLoS One. 2012;7(2):e32270.

185. Molla MD, Akalu Y, Geto Z, Dagnew B, Ayelign B, Shibabaw T. Role of Caspase-1 in the Pathogenesis of Inflammatory-Associated Chronic Noncommunicable Diseases. J Inflamm Res. 2020;13:749-64.

186. Chen H, Lu Y, Cao Z, Ma Q, Pi H, Fang Y, et al. Cadmium induces NLRP3 inflammasomedependent pyroptosis in vascular endothelial cells. Toxicol Lett. 2016;246:7-16.

187. Dhani S, Zhao Y, Zhivotovsky B. A long way to go: caspase inhibitors in clinical use. Cell Death & Disease. 2021;12(10):949.

188. Zhong X, Xie F, Chen L, Liu Z, Wang Q. S100A8 and S100A9 promote endothelial cell activation through the RAGE-mediated mammalian target of rapamycin complex 2 pathway. Mol Med Rep. 2020;22(6):5293-303.

189. Li C, Li S, Jia C, Yang L, Song Z, Wang Y. Low concentration of S100A8/9 promotes angiogenesis-related activity of vascular endothelial cells: bridges among inflammation, angiogenesis, and tumorigenesis? Mediators Inflamm. 2012;2012:248574.

190. Viemann D, Strey A, Janning A, Jurk K, Klimmek K, Vogl T, et al. Myeloid-related proteins 8 and 14 induce a specific inflammatory response in human microvascular endothelial cells. Blood. 2005;105(7):2955-62.

191. Croce K, Gao H, Wang Y, Mooroka T, Sakuma M, Shi C, et al. Myeloid-related protein-8/14 is critical for the biological response to vascular injury. Circulation. 2009;120(5):427-36.

192. Nakajima Y, Inagaki Y, Kido J, Nagata T. Advanced glycation end products increase expression of S100A8 and A9 via RAGE-MAPK in rat dental pulp cells. Oral Dis. 2015;21(3):328-34.

193. Schelbergen RF, Blom AB, van den Bosch MH, Slöetjes A, Abdollahi-Roodsaz S, Schreurs BW, et al. Alarmins S100A8 and S100A9 elicit a catabolic effect in human osteoarthritic chondrocytes that is dependent on Toll-like receptor 4. Arthritis Rheum. 2012;64(5):1477-87.

194. Liu Y, Kong X, You Y, Xiang L, Zhang Y, Wu R, et al. S100A8-Mediated NLRP3 Inflammasome-Dependent Pyroptosis in Macrophages Facilitates Liver Fibrosis Progression. Cells. 2022;11(22).

195. Jorch SK, McNally A, Berger P, Wolf J, Kaiser K, Chetrusca Covash A, et al. Complex regulation of alarmins S100A8/A9 and secretion via gasdermin D pores exacerbates autoinflammation in familial Mediterranean fever. J Allergy Clin Immunol. 2023;152(1):230-43.

196. Gerszten RE, Garcia-Zepeda EA, Lim YC, Yoshida M, Ding HA, Gimbrone MA, Jr., et al. MCP-1 and IL-8 trigger firm adhesion of monocytes to vascular endothelium under flow conditions. Nature. 1999;398(6729):718-23.

197. Pirhonen J, Sareneva T, Kurimoto M, Julkunen I, Matikainen S. Virus infection activates IL-1 beta and IL-18 production in human macrophages by a caspase-1-dependent pathway. J Immunol. 1999;162(12):7322-9.

198. Kinnunen K, Piippo N, Loukovaara S, Hytti M, Kaarniranta K, Kauppinen A. Lysosomal destabilization activates the NLRP3 inflammasome in human umbilical vein endothelial cells (HUVECs). J Cell Commun Signal. 2017;11(3):275-9.

199. Ramirez-Pedraza M, Fernández M. Interplay Between Macrophages and Angiogenesis: A Double-Edged Sword in Liver Disease. Frontiers in Immunology. 2019;10.

200. Endo-Umeda K, Nakashima H, Komine-Aizawa S, Umeda N, Seki S, Makishima M. Liver X receptors regulate hepatic F4/80+CD11b+ Kupffer cells/macrophages and innate immune responses in mice. Scientific Reports. 2018;8(1):9281.

201. dos Anjos Cassado A. F4/80 as a Major Macrophage Marker: The Case of the Peritoneum and Spleen. In: Kloc M, editor. Macrophages: Origin, Functions and Biointervention. Cham: Springer International Publishing; 2017. p. 161-79.

202. Rolot M, A MD, Javaux J, Lallemand F, Machiels B, Martinive P, et al. Recruitment of hepatic macrophages from monocytes is independent of IL-4R $\alpha$  but is associated with ablation of resident macrophages in schistosomiasis. Eur J Immunol. 2019;49(7):1067-81.

203. Zigmond E, Samia-Grinberg S, Pasmanik-Chor M, Brazowski E, Shibolet O, Halpern Z, et al. Infiltrating monocyte-derived macrophages and resident kupffer cells display different ontogeny and functions in acute liver injury. J Immunol. 2014;193(1):344-53.

204. Elchaninov A, Vishnyakova P, Menyailo E, Sukhikh G, Fatkhudinov T. An Eye on Kupffer Cells: Development, Phenotype and the Macrophage Niche. Int J Mol Sci. 2022;23(17).

205. Wen Y, Lambrecht J, Ju C, Tacke F. Hepatic macrophages in liver homeostasis and diseasesdiversity, plasticity and therapeutic opportunities. Cellular & Molecular Immunology. 2021;18(1):45-56.

206. Li W, Chang N, Li L. Heterogeneity and Function of Kupffer Cells in Liver Injury. Front Immunol. 2022;13:940867.

207. Kulle A, Thanabalasuriar A, Cohen TS, Szydlowska M. Resident macrophages of the lung and liver: The guardians of our tissues. Front Immunol. 2022;13:1029085.

208. Niu Z, Tang J, Zhang W, Chen Y, Huang Y, Chen B, et al. Caspase-1 promotes monocyte– macrophage differentiation by repressing PPARγ. The FEBS Journal. 2017;284(4):568-85.

209. Kim HY, Kim SJ, Lee SM. Activation of NLRP3 and AIM2 inflammasomes in Kupffer cells in hepatic ischemia/reperfusion. Febs j. 2015;282(2):259-70.

210. Kamo N, Ke B, Ghaffari AA, Shen XD, Busuttil RW, Cheng G, et al. ASC/caspase-1/IL-1 $\beta$  signaling triggers inflammatory responses by promoting HMGB1 induction in liver ischemia/reperfusion injury. Hepatology. 2013;58(1):351-62.

211. Huang H, Chen HW, Evankovich J, Yan W, Rosborough BR, Nace GW, et al. Histones activate the NLRP3 inflammasome in Kupffer cells during sterile inflammatory liver injury. J Immunol. 2013;191(5):2665-79.

# 9 APÊNDICES

## Apêndice I

Tabela 2. Relação de anticorpos utilizados para imunofenotipagem de neutrófilos, monócitos e células de Kupffer de murino, e células endoteliais (HUVEC).

Célula Alvo	Anticorpos/Antígeno Alvo	Diluição	
Neutrófilos	Rat anti-mouse CD11b - APC	1:100	
	Rat anti-mouse Ly6G - PE	1:200	
Monócitos	Mouse anti-CD43 – PE	1:100	
	Mouse anti-Ly6C - APC	1:100	
	Rat anti-mouse F4/80 - PE	1:60	
Células de Kuppfer	Rat anti-human/mouse -CD11b - PerCp	1:60	
	Rat anti-mouse CD206 - APC	1:60	
	Mouse Anti-CD54 (ICAM-1) - PerCp	1:20	
HUVEC	Mouse anti-human CD106 (VCAM-) - APC	1:20	
	Mouse anti-human CD62E (E-Selectina) - PE	1:20	
FAM-YV	1:40		

### **Apêndice II**

#### Neutrófilos







Figura 37. Representação da estratégia de *gate* utilizada para avaliação de caspase-1 ativa (FLICA<sup>+</sup>) em neutrófilos e monócitos de camundongos C57BL6. As estimativas de tamanho (*Forward Scatter* -FSC) e granulosidade (*Side Scatter* -SSC) foram aplicadas em lisado de sangue total para identificar as populações específicas de granulócitos e células mononucleares, que posteriormente foram distinguidas em neutrófilos e monócitos pela expressão relativa dos marcadores de superfície. A aquisição foi realizada no citômetro de fluxo FACSCalibur e analisadas pelo software FlowJo V10 (Becton Dickinson<sup>®</sup>).

### **Apêndice III**



#### Células de Kuppfer murino

Figura 38. Representação da estratégia de *gate* utilizada para avaliação de caspase-1 ativa (FLICA<sup>+</sup>) em células de Kuppfer (macrófagos de tecido hepático) de camundongos C57BL6. As estimativas de tamanho (*Forward Scatter* -FSC) e granulosidade (*Side Scatter* -SSC) foram aplicadas em suspensão celular do figado para identificar as populações específicas de células não-parenquimais (NPCs), que posteriormente foram distinguidas em macrófagos através expressão relativa dos marcadores de superfície. A aquisição foi realizada no citômetro de fluxo FACSCalibur e dados analisados pelo software FlowJo V10 (Becton Dickinson<sup>®</sup>).

### **Apêndice IV**



#### Células endoteliais de cordão umbilical humano (HUVEC)

Figura 39. Representação da estratégia de *gate* utilizada para avaliação de caspase-1 ativa (FLICA<sup>+</sup>) em células endoteliais de cordão umbilical humano (HUVECs). As estimativas de tamanho (*Forward Scatter* -FSC) e granulosidade (*Side Scatter* -SSC) foram aplicadas em suspensão celular (1 x 10<sup>5</sup> células/ mL). As analises de expressão de CD54, CD106, CD62E na superfície de caspase-1 ativada (FLICA<sup>+</sup>) intracelular foram mensuradas por histogramas dentro do *gate* de células. A aquisição foi realizada no citômetro de fluxo FACSCalibur e dados foram analisados pelo software FlowJo V10 (Becton Dickinson<sup>®</sup>).

### Apêndice V

Célula Gene Forward  $(5' \rightarrow 3')$ Reverse  $(5' \rightarrow 3')$ Alvo NLRP3 GACTCTTGCACCCCGACTG CTGGCTGGAGGTCAGAAGTGT CASP1 GCCCACCACTGAAAGAGTG CACTTCCTGCCCACAGACAT HUVEC PYCARD CTCCTCAGTCGGCAGCCAAG TGTGACCCTCGCGATAAGC (ASC) IL1B ATGATGGCTTATTACAGTGGCAA GTCGGAGATTCGTAGCTGGA

Tabela 3. Relação da sequência dos iniciadores utilizados para a RT-PCR

Legenda: FW= Forward; RW = Reverse

### Apêndice VI

	Salina	Hemólise (HEM)				
Parâmetro	CON	15min	1h	3hrs	6h	Valor P
	n= 12-38	n= 12	n= 9	n= 16	n= 14	•
Eritrócitos	7,5 ± 0,1	7,9 ± 0,2	7,7 ± 0,1	7,2 ± 0,2	7,3 ± 0,2	>0,05
(x10 <sup>6</sup> /μL)	(8,5/7,7/8,4)	(6,8/8,1/6,9)	(7,0/7,8/7,0)	(5,8/7,2/5,9)	(6,0/7,2/6,1)	
PLT	1004 ± 21	956 ± 42	999 ± 47	803± 62*	975 ± 47	<0,05
(x10³/µL)	(746/985/1271)	(744/1010/1142)	(761/976/12)	(115/823/1229)	(711/945/1374)	
Hb (g/dL)	11,9 ± 0,1	12,8 ± 0,2*	12,4 ± 0,2	12,0 ± 0,2	11,9 ± 0,2	<0.0E
	(10/12/14)	(12/13/14,0)	(11/12/13)	(10/12/13)	(10/12/13)	<b>NU,US</b>

Tabela 4. Perfil hematológico dos camundongos controle salina e de camundongos submetidos à hemólise intravascular aguda.

Legenda: PLT = plaquetas, Hb = hemoglobina. Média ± erro, min/ mediana/ máximo. \* valor de P comparado ao grupo controle Salina. Valores determinados por ANOVA, pós teste de Bonferroni.

**Apêndice VII** 

Representação da estratégia de *gate* utilizada para a contagem e imunofenotipagem de leucócitos CD11b de sangue total de camundongos por citometria de fluxo.



NEUTRO HEMOLISE 2 1H.018 Figure 40. Representação da estratégia filo de stratégia filo de serveres são de expressão de expressão de expressão de comunicação de estratégia filo de serveres de camundongos C57BL6. As estimativas de tamanho (Forward Scatter -FSC) e granulosidade (Side Scatter -SSC) foram aplicadas em lisado de sangue total Granulocytes Monocytes para identificar as possible específicas de granulócito contrativa de tamanho (Forma analisadas quanto a frequência de CD11b+ (total o CD11b high e Cd11b<sup>low</sup>. A aquisição foi realizada no citômetro de fluxo FACSCalibur e dados analisados pelo software FlowJo V10 Dickinson®).

NEUTRO SALINA 5 1H.016 Ungated 20185

NEUTRO SALINA 5 1H.016 Granulocytes\_Monocytes 13385 NEUTRO SALINA 5 1H.016 Granulocytes\_Monocytes 13385

#### **Apêndice VIII**



Figura 41. Contagem e imunofenotipagem de leucócitos de camundongos controle salina e camundongos submetidos a hemólise intravascular aguda. As amostras de sangue total foram coletadas após 15 minutos, 1 hora e 3 horas da administração intravenosa de NaCl 0,9% estéril (CON, em azul; n= 36), ou água estéril (HEM, em bordô; n= 6-22). Os ensaios foram realizados por citometria de fluxo em amostras marcadas com anti-CD11b. As populações de granulócitos e de mononucleares foram diferenciados por FSC x SSC, e as análises subsequentes foram realizadas para a identificação da frequência em porcentagem de células CD11b<sup>low</sup> (A) ou CD11b<sup>high</sup> (B), ou para a quantificação total da intensidade média de fluorescência (MFI) da expressão CD11b<sup>low</sup> (C) ou CD11b<sup>high</sup> (D). Os resultados estão expressos como médias ± SEM; valor de P determinado por teste de Šídák (A e D), Dunnet (B), Kruskal-Wallis (C).

### **Apêndice IX**



Figura 42. Efeito da uma única administração de fenilhidrazina (PHZ) na expressão hepática de NLRP3 e formas precursoras e clivadas de IL-1 $\beta$  e caspase-1. Os homogenatos de fígado foram analisados por Western blot para avaliação da a expressão do inflamassoma NLRP3 (A), pró-IL-1 $\beta$  (B) e IL-1 $\beta$  clivada (subunidade p15; C) e de pró-caspase-1(pro casp-1; E) e ativa (casp-1 subunidade p20 e p15; F e G). O extrato total dos fígados dos camundongos foram coletados após 48 horas após da única dose (Única) de PHZ (10mg/Kg) ou salina (NaCl 0,9%). As densidades de banda foram normalizadas usando a expressão GAPDH de cada amostra. Em (D) Os níveis de citocina IL-1 $\beta$  foram mensurados por ELISA a partir de homogeneizados hepático. Os valores obtidos foram corrigidos pela concentração de proteínas total, anteriormente quantificado por Bradford. Os resultados estão expressos como médias  $\pm$  SEM e foram determinados por teste t de Student. Os resultados indicam que, em comparação com o

grupo submetido à hemólise crônica (HEM Crônica), uma única dose de PHZ não afetou a expressão de NLRP3 no figado dos camundongos C57BL6. Por outro lado, essa única dose resultou em uma redução significativa tanto nas formas precursoras quanto nas clivadas de IL-1β e caspase-1, diferenças que não foram totalmente evidentes nos animais do grupo HEM Crônica. De maneira análoga ao grupo HEM Crônica, não foram observadas variações significativas na concentração hepática de IL-1β solúvel.

### Apêndice X



Figura 43. Produção e liberação de citocinas pró-inflamatórias (A e B) e de Caspase-1 ativada (C e D) na hemólise intravascular crônica induzida por PHZ. (A e B) Concentração dos níveis plasmáticos de Il-1 $\beta$  e IL-18 de camundongos 48 horas após uma (Única) administração de fenilhidrazina (PHZ-10mg/Kg) ou salina (NaCl 0,9%). (C e D). Os ensaios foram realizados por citometria de fluxo a partir de sangue total previamente incubado com anticorpo anti-CD16/32 para bloqueio de ligações inespecificas FcR. Para identificação de neutrófilos foi utilizado anticorpos anti-Ly6G-APC e anti-CD11b-PE (C); ou anti-Ly6C-APC e anti-CD43-PE para identificação de monócitos (D); e FAM-YVAD-FLICA-FITC para identificação de caspase-1 ativa. Os resultados estão expressos como médias  $\pm$  SEM e foram determinados por test t de Student. \* P<0,05; \*\* P<0,01 comparado grupo Salina. Esses dados mostram que, embora a administração única de PHZ tenha gerado uma atividade de caspase-1 mais pronunciada em monócitos dos camundongos C57BL6, em comparação com a HEM crônica, a dose única de PHZ não resultou no aumento da liberação de IL-1 $\beta$  e IL-18 nos animais, ao contrário da resposta observada nos camundongos HEM crônica.



Figura 44. Avaliação da expressão de moléculas de adesão em células endoteliais de cordão umbilical humano (HUVECs) estimuladas com heme. As células  $(2x10^5)$  foram cultivadas em meio F12K suplementado com 0.1% de soro fetal bovino (SFB) por 3 horas na presença de heme  $(25 - 100 \,\mu\text{M})$  ou na ausência dos estímulos (Basal) a 37°C, em 5% de CO<sub>2</sub>. A porcentagem de HUVECs que expressam ICAM-1, VCAM-1, E-selectina e FLICA foram avaliadas por citometria de fluxo. Os resultados estão expressos como médias  $\pm$  SEM para culturas em duplicatas ou triplicatas e são representativos de 4 experimentos independentes. Valor de P determinado por teste de Dunn (A), Dunnett (C) e de Holm-Šídák (B,D).

### **Apêndice XII**



Figura 45. Efeitos da S100A8 na ativação de células endoteliais de cordão umbilical humano (HUVECs) induzida por heme. As HUVECs ( $2x10^5$  células) foram incubadas na ausência dos estímulos (Basal) ou na presença de heme ( $50\mu$ M) por 3 horas, ou pré-estimuladas com S100A8 ( $1\mu$ g/mL) por 3 horas antes da incubação com heme, em meio F12K suplementado com SFB 0.1%, a 37°C, em 5% de CO<sub>2</sub>. A porcentagem de HUVECs que expressam ICAM-1, VCAM-1, E-selectina e FLICA foram avaliadas por citometria de fluxo. Os resultados estão expressos como médias  $\pm$  SEM para culturas duplicatas ou triplicatas e são representativos de 4-6 experimentos independentes. Valor de P determinado por teste Šídák (A-C) ou de Holm-Šídák (D).

### **Apêndice XIII**



Figura 46. Efeitos da incubação de células endoteliais de cordão umbilical humano (HUVECs) com inibidor de caspase-1 na indução de moléculas de adesão endotelial estimuladas por heme. As HUVECs  $(2x10^5 \text{ células})$  foram previamente tratadas por 1 hora com inibidor da atividade de caspase-1 YVADcmk (10 µM; colunas preenchidas em pontos - YVAD) ou com veículo DMSO (0.01% em PBS estéril, colunas vazias). Após as células foram incubadas na ausência dos estímulos (Basal) ou na presença de heme (50µM) por 3 horas em meio F12K suplementado com SFB 0.1%, a 37°C, em 5% de CO<sub>2</sub>. A porcentagem de HUVECs que expressam ICAM-1, VCAM-1, E-selectina e FLICA foram avaliadas por citometria de fluxo. Os resultados estão expressos como médias  $\pm$  SEM para culturas duplicatas e são representativos de 4 experimentos independentes. Valor de P determinado por teste Tukey (A e D) ou de Holm-Šídák (B-C).



Figura 47. Efeitos da incubação de células endoteliais de cordão umbilical humano (HUVECs) com inibidor de caspase-1 na indução de moléculas de adesão endotelial estimuladas por heme e S100A8. As HUVECs ( $2x10^5$  células) foram previamente tratadas por 1 hora com inibidor da atividade de caspase-1 YVAD-cmk (10 µM; colunas preenchidas em pontos - YVAD) ou com veículo DMSO (0.01% em PBS estéril, colunas vazias). Após as células foram incubadas na ausência dos estímulos (Basal) ou na presença de heme (50µM) por 3 horas, ou pré-estimuladas com S100A8 (1µg/mL) por 3 horas antes da incubação com heme, em meio F12K suplementado com SFB 0.1%, a 37°C, em 5% de CO<sub>2</sub>. A porcentagem de HUVECs que expressam ICAM-1, VCAM-1, E-selectina e FLICA foram avaliadas por citometria de fluxo. Os resultados estão expressos como médias  $\pm$  SEM para culturas

duplicatas e são representativos de 4 experimentos independentes. Valor de P determinado por teste Holm-Šídák (A e D) ou Šídák (B-C).

## **10 ANEXOS**





#### CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada INVESTIGAÇÃO IN VIVO DOS EFEITOS DA HEMÓLISE INTRAVASCULAR AGUDA E CRÔNICA NA FORMAÇÃO DE INFLAMASSOMAS, registrada com o nº 5144-1(A)/2022, sob a responsabilidade de Prof. Dr. Nicola Conran Zorzetto e Pamela Lara de Brito, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo *Chordata*, subfilo *Vertebrata* (exceto o homem) para fins de pesquisa científica (ou ensino), encontra-se de acordo com os preceitos da LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, do DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), tendo sido aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP, em reunião de 15/08/2022.

Finalidade:	() Ensino ( X ) Pesquisa Científica
Vigência do projeto:	01/09/2022 a 01/03/2023
Vigência da autorização	15/08/2022 a 01/03/2023
para manipulação animal:	
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo isogênico / C57BL/6J
No. de animais:	10
Idade/Peso:	4.00 Semanas / 25.00 Gramas
Sexo:	10 Machos
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo isogênico / C57BL/6J
No. de animais:	10
Idade/Peso:	4.00 Semanas / 25.00 Gramas
Sexo:	10 Machos
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo isogênico / C57BL/6J
No. de animais:	10
Idade/Peso:	4.00 Semanas / 25.00 Gramas
Sexo:	10 Machos
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo isogênico / C57BL/6J
No. de animais:	10
Idade/Peso:	4.00 Semanas / 25.00 Gramas
Sexo:	10 Machos
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo isogênico / C57BL/6J
No. de animais:	10
Idade/Peso:	4.00 Semanas / 25.00 Gramas
Sexo:	10 Machos
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo isogênico / C57BL/6J

Documento assinado. Verificar autenticidade em sigad.unicamp.br/verifica

Informar código 37E5BC4A DB8E4B11 91185B6F DAFD30DA
CERTIFICADO CEUA nº 227/2022

No. de animais:	10			
Idade/Peso:	4.00 Semanas / 25.00 Gramas			
Sexo:	10 Machos			
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo isogênico / C57BL/6J			
No. de animais:	10			
Idade/Peso:	4.00 Semanas / 25.00 Gramas			
Sexo:	10 Machos			
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo isogênico / C57BL/6J			
No. de animais:	10			
Idade/Peso: 4.00 Semanas / 25.00 Gramas				
Sexo:	10 Machos			
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo isogênico / C57BL/6J			
No. de animais:	10			
Idade/Peso:	4.00 Semanas / 25.00 Gramas			
Sexo:	10 Machos			
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo isogênico / C57BL/6J			
No. de animais:	10			
Idade/Peso:	4.00 Semanas / 25.00 Gramas			
Sexo:	10 Machos			
Origem:	gem: Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica na			
	Área de Ciências de Animais de Laboratório - CEMIB			
Biotério onde serão	• Biotério do Laboratório de Biologia Molecular e			
mantidos os animais:	Hemostasia, HEMOCENTRO/UNICAMP			

A aprovação pela CEUA/UNICAMP não dispensa autorização a junto ao **IBAMA,SISBIO** ou **CIBio** e é **restrita** a protocolos desenvolvidos em biotérios e laboratórios da Universidade Estadual de Campinas.

Campinas, 18 de agosto de 2022.

Prof. Dr. Wagner José Fávaro	Rosangela dos Santos			
Presidente	Secretária Executiva			
IMPORTANTE: Pedimos atenção ao prazo para envio do relatório final de atividades referente a este protocolo: até 30 dias após o encerramento de sua				
vigência. O formulário encontra-se disponível na página da CEUA/UNICAMP, área do pesquisador responsável. A não apresentação de relatório no prazo				
estabelecido impedirá que novos protocolos sejam submetidos.				

Documento assinado. Verificar autenticidade em sigad.unicamp.br/verifica Informar código 37E5BC4A DB8E4B11 91185B6F DAFD30DA Documento assinado eletronicamente por **WAGNER JOSE FAVARO**, **PRESIDENTE DA CEUA/UNICAMP**, em 22/08/2022, às 10:38 horas, conforme Art. 10 § 2º da MP 2.200/2001 e Art. 1º da Resolução GR 54/2017.

Documento assinado eletronicamente por **ROSANGELA DOS SANTOS**, **SECRETÁRIA EXECUTIVA DA CEUA/UNICAMP**, em 18/08/2022, às 09:44 horas, conforme Art. 10 § 2º da MP 2.200/2001 e Art. 1º da Resolução GR 54/2017.



A autenticidade do documento pode ser conferida no site: sigad.unicamp.br/verifica, informando o código verificador: 37E5BC4A DB8E4B11 91185B6F DAFD30DA







#### CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada <u>INVESTIGAÇÃO IN VIVO DOS EFEITOS DA HEMÓLISE</u> <u>INTRAVASCULAR AGUDA E CRÔNICA NA FORMAÇÃO DE INFLAMASSOMAS</u>, registrada com o nº <u>5144-1/2019</u>, sob a responsabilidade de <u>Profa. Dra. Nicola Conran Zorzetto</u> e <u>Pamela Lara de Brito</u>, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo *Chordata*, subfilo *Vertebrata* (exceto o homem) para fins de pesquisa científica (ou ensino), encontra-se de acordo com os preceitos da LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, do DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), tendo sido aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP, em <u>19 de</u> <u>fevereiro de 2019</u>.

Finalidade:	( ) Ensino ( X ) Pesquisa Científica		
Vigência do projeto:	01/03/2019 - 01/03/2023		
Vigência da autorização para	01/03/2019 - 01/03/2023		
manipulação animal:			
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo isogênico / C57BL/6J		
No. de animais:	336		
Idade/Peso:	04 semanas / 30 g		
Sexo:	machos		
Origem:	CEMIB/UNICAMP		
Biotério onde serão mantidos os	Biotério do Laboratório de Biologia Molecular e Hemostasia,		
animais:	HEMOCENTRO/UNICAMP		

A aprovação pela CEUA/UNICAMP não dispensa autorização junto ao IBAMA, SISBIO ou CIBio e é restrita a protocolos desenvolvidos em biotérios e laboratórios da Universidade Estadual de Campinas.

Campinas, 01 de março de 2019.

Prof. Dr. Wagner José Fáva Presidente

Rosangela dos Santos Secretária Executiva

IMPORTANTE: Pedimos atenção ao prazo para envio do relatório final de atividades referente a este protocolo: até 30 dias após o encerramento de sua vigência. O formulário encontra-se disponível na página da CEUA/UNICAMP, área do pesquisador responsável. A não apresentação de relatório no prazo estabelecido impedirá que novos protocolos sejam submetidos. OF. CEP nº 75/2022



Cidade Universitária "Zeferino Vaz", 01 de setemnro de 2022.

SIGAD: Of. CEP nº 075/2022

Dra. Pamela Lara de Brito Pesquisadora Responsável

#### REF.: DISPENSA DE APRESENTAÇÃO DE PROJETO DE PESQUISA PARA AVALIAÇÃO DO SISTEMA CEP-CONEP.

Prezada Senhora,

Informamos que a pesquisa intitulada "INVESTIGAÇÃO IN VIVO DOS EFEITOS DA HEMÓLISE INTRAVASCULAR AGUDA E CRÔNICA NA FORMAÇÃO DE INFLAMASSOMAS", para fins de Doutorado do Programa de Pós-graduação da Fisiopatologia Médica, Faculdade de Ciências Médicas – UNICAMP, sob a orientação da Dra. Nicola Amanda Conran Zorzetto, propõe investigar *in vitro*, os efeitos do heme na ativação de células endoteliais e liberação de alarmina e de citocinas por estas células não hematopoiéticas. Para a investigação *in vitro*, células endoteliais de veia umbilical humana (HUVEC) e células endoteliais microvasculares humana (HMEC-1) adquiridas da *American Type Culture Collection* (Manassas, VA, EUA) serão cultivadas com meio de cultura F12K ou MCDB131 em estufa a 37°C com 5% CO<sub>2</sub>.

Deste modo, baseados no resumo apresentado, a referida pesquisa não necessita tramitar pelo Comitê de Ética em Pesquisas envolvendo Seres Humanos, tendo em vista que serão utilizadas células de linhagens celulares cultivadas em laboratório.

Ressaltamos que se houver qualquer alteração no escopo do projeto, na qual envolva seres humanos, o CEP/Unicamp deve ser informado para fins de deliberação sobre essas mudanças.

Atenciosamente,

#### Dra. Renata Maria dos Santos Celeghini COORDENADORA DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA UNICAMP

Rua: Tessália Vieira de Camargo, 126			
13083-887 Campinas - SP			
(*) http://www.prp.upicamp.br/cep			

Fone: (019) 3521-8936 Fone: (019) 3521-7187 cep@unicamp.br

Documento assinado. Verificar autenticidade em sigad.unicamp.br/verifica Informar código A4294EAC D36A41D0 8FD54FF1 56FCFBED

#### ANEMIA HEMOLÍTICA AUTOIMUNE MISTA COM PLAQUETOPENIA COMO MANIFESTAÇÃO INICIAL DE LÚPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO

BR Lima, LM Moraes, LJM Silva, AS Ferreira, LGD Paolo, B Pavan, CH Dosualdo, MFG Severino, RS Colombo, TCFD Santos

Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (FAMERP), São José do Rio Preto, SP, Brasil

Introdução/Objetivos: Discussão de um caso clínico sobre AHAI mista, em paciente jovem, como apresentação atípica de LES do Hospital de Base de São José do Rio Preto Material e métodos: Os dados foram obtidos de forma sistemática por meio de entrevista com o paciente e revisão do prontuário. Resumo: Paciente feminina, previamente hígida, encaminhada ao serviço do Hospital de Base de São José do Rio Preto, devido anemia grave e sintomática, associado a história de prurido em todo o corpo, poliartralgia de grandes articulações, além de algumas placas descamativas em tornozelos, cotovelos e joelhos. Na admissão solicitado suporte transfusional e na avaliação pré transfusional evidenciado pesquisa de anticorpos irregulares PAI positiva e painel reagente para todas as hemácias. Teste de antiglobulina direto TAD positivo para IgG, IgM e da fração C3d em alta intensidade. Durante internação visto em exames laboratoriais Hb 6.0 g/dL Ht 16.9% VCM 123 fL HCM 50 pg RDW 29 Leucocitos 16200 mm<sup>3</sup> Plaquetas 39.000 mm<sup>3</sup>, Bilirrubina indireta 1.35 mg/dL, Desidrogenase Láctica 1160, Reticulócito 12%, além de FAN positivo nuclear pontilhado denso 1/640 associado a baixos níveis de C4: 7.30, sorologias negativas e tomografias de corpo total sem linfonodomegalias de grande monta. Em conjunto com a equipe da reumatologia feita a hipótese de LES associado ao quadro e optado por corticoterapia associado а imunossupressão com Rituximab quatro sessões, além do tratamento da condição de base com Hidroxicloroquina. Paciente atualmente com resolução completa da plaquetopenia, mantendo anemia leve, assintomática e em acompanhamento ambulatorial. Discussão: Anemias hemolíticas autoimunes são caracterizadas por produção de anticorpos contra os próprios eritrócitos. São classificadas a depender da temperatura em que os anticorpos se ligam aos eritrócitos. Na anemia hemolítica ao frio a temperatura ótima de reação ocorre entre 0-4°C e ela corresponde por cerca de 25% dos casos. Já na anemia hemolítica a quente a temperatura ótima de reação ocorre aos 37°C. Na anemia hemolítica mista o plasma possui anticorpos quentes (IgG) e frios (IgM). As anemias hemolíticas podem ser primárias idiopáticas ou secundárias a diversas causas como uso de fármacos, neoplasias, distúrbios linfoproliferativos, reumatológicas ou infecciosas. O quadro clínico decorre principalmente dos sintomas relacionados à anemia. As anemias hemolíticas autoimunes quentes e as mistas possuem boa resposta a corticoterapia, diferentemente dos casos de anemia hemolítica a frio. Nos casos secundários o tratamento principal deve ser direcionado a doença subjacente. Conclusão: Quadros sugestivos de anemia hemolítica autoimune devem sempre ser avaliados quanto a causas secundárias. No caso descrito acima foi possível identificar doença reumatológica e seguir com tratamento direcionado ao fator subjacente levando ao controle da hemólise e resolução dos sintomas, como consequência garantindo maior qualidade de vida ao paciente.

https://doi.org/10.1016/j.htct.2023.09.193

#### ATIVAÇÃO DE CASPASE-1 CONTRIBUI PARA INTERAÇÕES LEUCÓCITOS-ENDOTÉLIO INDUZIDAS PELA HEMÓLISE INTRAVASCULAR

PL Brito, EMFG Azevedo, LFS Gushiken, FC Leonardo, FF Costa, N Conran

Centro de Hematologia e Hemoterapia (Hemocentro), Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, SP, Brasil

As doenças hemolíticas, como a anemia falciforme (AF), constituem um grupo de condições caracterizadas pela destruição prematura das hemácias (hemólise), que pode ocorrer ainda no interior dos vasos sanguíneos (intravascular; HI) ou no espaço extravascular. A HI resulta na liberação de padrões moleculares associados a danos eritrocitários (eDAMPs), induzindo inflamação e resposta imune. A caspase-1 (Casp-1) é uma protease que possui um papel importante na inflamação, iniciando processo de piroptose e clivagem da (pro)interleucina (IL) $1\beta$  para sua forma ativa, IL-1β, através da ativação de inflamassomas. Nosso objetivo foi elucidar os mecanismos envolvidos na inflamação induzida pela HI, a ativação da Casp-1 e seu papel nas alterações microvasculares. A HI aguda foi induzida pela administração (i.v.) de água estéril em camundongos C57BL/6 (HEM) e salina para os controles (CON). Camundongos HEM e CON receberam inibidor de Casp-1, YVAD (i.p.) 1h antes dos estímulos. A técnica de microscopia intravital (MIV) foi realizada no músculo cremaster para quantificar o rolamento e a adesão dos leucócitos (WBC) venulares (n = 3). A perfusão sanguínea dos animais foi avaliada por fluxometria laser Doppler (FLD) na microvasculatura da pele da pelve (n=6-8). Citocinas e proteínas plasmáticas foram quantificadas por ELISA e testes colorimétricos (n = 3-8). Atividade de Casp-1 foi mesurada por sonda intracelular FAM-FLICA através de citometria de fluxo (n = 4-8). Identificamos que camundongos HEM apresentaram aumento de heme plasmático (p < 0,0001) e hemoglobina livre (p < 0,001), associado a uma diminuição significativa de haptoglobina plasmática (p < 0,05), em comparação com os camundongos CON, confirmando a HI. A proteína S100A8 é uma alarmina secretada por WBC ativados que induz a formação de inflamassomas em células imunes. De forma consistente, os camundongos HEM exibiram aumento na concentração plasmática de S100A8 e IL-1 $\beta$  (p < 0,001). Além disso, essas alterações foram seguidas por aumentos nos níveis plasmáticos de TNF- $\alpha$  e IL-6 (p < 0,001). Os números de monócitos Ly6C<sup>hi</sup>CD43<sup>+</sup> e neutrófilos Ly6G<sup>hi</sup>CD11<sup>+</sup> positivos para FLICA foram significativamente maiores em camundongos HEM, em comparação com CON (p < 0,05), sugerindo a ativação de Casp-1 nessas células. Para investigar o papel da ativação da Casp-1, induzida pela HI, na dinâmica microvascular, camundongos HEM e CON tradados com inibidor de Casp-1, YVAD, foram submetidos a MIV e FLD. A HI provocou o aumento do rolamento e adesão de WBC à parede vascular de camundongos com HEM em comparação aos animais CON (p < 0,0001), conforme demonstrado anteriormente. Além disso, os camundongos HEM exibiram redução na velocidade do fluxo sanguíneo (p < 0,01), comprometendo a perfusão microvascular (p < 0,01). Por fim, a inibição da Casp-1, antes da HI, reduziu o rolamento (p < 0,01) e a adesão (p < 0,05) de WBC às paredes dos vasos, revertendo a diminuição da perfusão sanguínea microvascular induzida pela HI (p < 0,01). Esses resultados demonstram que a HI resulta em alterações microvasculares associadas à liberação de moléculas próinflamatórias e à ativação de Casp-1, contribuindo para processos semelhantes à oclusão vascular. Assim, este estudo sugere que a ativação da Casp-1 e suas vias associadas podem ser um potencial alvo terapêutico para mitigar os efeitos da HI, que ocorre em anemias hemolíticas graves, como a AF. Financiamento: CAPES, FAPESP.

#### https://doi.org/10.1016/j.htct.2023.09.194

#### FATORES ASSOCIADOS À OCORRÊNCIA DE HIPER-HEMÓLISE EM PACIENTES COM DOENÇA FALCIFORME

BVM Andrade <sup>a,b</sup>, ICG Moura <sup>a</sup>, MC Ozahata <sup>a</sup>, SOG Mateos <sup>c</sup>, DTS Cruz <sup>d</sup>, CL Dinardo <sup>e</sup>

<sup>a</sup> Universidade de São Paulo (USP), São Paulo, SP, Brasil

- <sup>b</sup> Fundação Centro de Hematologia e Hemoterapia do Estado de Minas Gerais (Hemominas), Belo Horizonte, MG, Brasil
- <sup>c</sup> Universidade Municipal de São Caetano do Sul (USCS), São Caetano do Sul, SP, Brasil
- <sup>d</sup> Fundação de Hematologia e Hemoterapia de

- Pernambuco (HEMOPE), Recife, PE, Brasil <sup>e</sup> Fundação Pró-Sangue Hemocentro de São Paulo,
- São Paulo, SP, Brasil

Introdução: A transfusão de sangue é um recurso terapêutico de grande importância para pacientes com doença falciforme (DF). Entre as complicações associadas às transfusões de sangue, a aloimunização a antígenos eritrocitários é frequente, associando-se à ocorrência de reações hemolíticas pós transfusionais (RHPT). Pacientes com DF são susceptíveis à ocorrência de RHPT de gravidade bastante heterogênea. Em casos extremos, há redução dos níveis de hemoglobina em relação aos pré transfusionais, denotando a ocorrência de destruição de eritrócitos próprios do paciente, além dos transfundidos, por via não totalmente esclarecida. A esta condição se dá o nome de Síndrome de Hiper-hemólise (HS). A predição de ocorrência de HS permite a realização de profilaxia com administração pré-transfusional da droga anti-CD20 (rituximab). Há poucos estudos em literatura que exploraram os fatores de risco clínico para ocorrência de HS. Objetivos: Determinar quais são os fatores clínicos associados à ocorrência de HS em pacientes com DF. Métodos: Trata-se de estudo caso-controle tendo como fonte os pacientes cadastrados na coorte do Estudo Longitudinal Multicêntrico da Doença Falciforme - REDS-III, de 2013 a 2018, em quatro centros brasileiros: Hemominas, Hemope, Hemorio e ITACI - Instituto de

Tratamento do Câncer Infantil. Identificamos 13 casos de pacientes já transfundidos que apresentaram HS. Para cada caso foram selecionados quatro controles. Os grupos foram comparados em termos sociodemográficos, epidemiológicos, laboratoriais e clínicos. As análises foram realizadas no programa R versão 4.0.5 e foi considerado significativo p < 0,05. Resultados: Os pacientes que tiveram HS apresentaram maior proporção de anticorpos irregulares (p=0,001). A ocorrência de HS não se associou às características sociodemográficas e epidemiológicas avaliadas, e nem ao genótipo DF. Os resultados laboratoriais não diferiram entre aqueles que apresentaram ou não o desfecho. Conclusão: Os pacientes com DF que desenvolveram HS na Coorte do REDS III apresentaram os anticorpos antieritrocitários como marcadores primordiais para a ocorrência de HS. O número de bolsas transfundidas ao longo da vida e as transfusões por evento agudo, (internação por crise de dor) podem ser um indicativo de maior risco para a ocorrência de HS. Esses dados são importantes para definir um grupo de pacientes mais suscetível a HS, que poderiam ser elegíveis para o uso profilático de rituximabe. É necessário delinear novos estudos, com maior número de amostras, capazes de esclarecer o diagnóstico, fisiopatologia e definir o melhor tratamento para essa complicação.

#### https://doi.org/10.1016/j.htct.2023.09.195

#### REAL-WORLD DATA ON THE TREATMENT OF SICKLE CELL DISEASE WITH VOXELOTOR: RESULTS FROM A BRAZIL'S EARLY ACCESS PROGRAM

RD Cancado<sup>a</sup>, ACS Pinto<sup>b</sup>, AS Araujo<sup>c</sup>, CLC Lobo<sup>d</sup>, MS Figureido<sup>e</sup>

 <sup>a</sup> Department of Hematoloty/Oncology, Hospital Samaritano, São Paulo, Brazil
<sup>b</sup> Regional Blood Center, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP), Universidade de São Paulo (USP), Ribeirão Preto, Brazil
<sup>c</sup> Department of Hematology, Fundação de Hematologia e Hemoterapia de Pernambuco (HEMOPE), Recife, Brazil
<sup>d</sup> Department of Clinical Research, Instituto Estadual de Hematologia Arthur de Siqueira Cavalcanti (Hemorio), Rio de Janeiro, Brazil
<sup>e</sup> Department of Clinical and Experimental Oncology, Escola Paulista de Medicina (EPM), Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), São Paulo, Brazil

Introduction: Voxelotor, is a first-in-class modifying therapy approved to treat patients with sickle cell disease (SCD), a once-daily, oral treatment that reversibly binds to the a-chain of hemoglobin (Hb) and modulates its affinity for oxygen, inhibits Hb S polymerazation, preventing HbS sickling and reducing hemolysis in patients with SCD. Therapeutic approach can be as single agent or in combination with hydroxyurea (HU). Voxelotor was approved by the FDA in 2019 for children over 12 years and from 2021, for children over 4 years. While voxelotor is not yet approved in Brazil,

S65





#### Blood 142 (2023) 1078–1079

## The 65th ASH Annual Meeting Abstracts

# **POSTER ABSTRACTS**

#### 101.RED CELLS AND ERYTHROPOIESIS, EXCLUDING IRON

#### Caspase-1 As a Therapeutic Target in Intravascular Hemolysis-Induced Microvascular Inflammation and Occlusive Processes

Pamela L Brito, MSc<sup>1</sup>, Erica M.F. Gotardo<sup>1</sup>, Lucas F.S. Gushiken, PhD<sup>1</sup>, Flavia C. Leonardo<sup>1</sup>, Fernando Ferreira Costa, MD PhD<sup>1</sup>, Nicola Conran, PhD<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Hematology and Transfusion Center, University of Campinas - UNICAMP, Campinas, Brazil

<sup>2</sup>Hematology and Transfusion Center, University of Campinas - UNICAMP, Campinas, Brazil

Hemolytic anemias, such as sickle cell disease (SCD), are a group of acute and acquired conditions characterized by the accelerated destruction of red blood cells (RBC). Intravascular hemolysis (IVH), or RBC lysis within the bloodstream, incurs the release of damage-associated molecular patterns (DAMPs), trigging cell activation and immune responses. Caspase-1 (Casp-1), a protease enzyme, plays a critical role during inflammatory processes by initiating programed cell death and promoting the cleavage of pro-interleukin (IL)-1 $\beta$  into its active form, IL-1 $\beta$ , through inflammasome assembly.

Here, we aimed to elucidate the complex mechanisms involved in IVH-induced inflammation, leukocyte-endothelium interactions, and microvascular dynamics. Acute IVH was induced in C57BL/6 mice (HEM) by the injection of sterile water (i.v., 150  $\mu$ I), and control mice received i.v. saline (CON) (n=3-8 per group). Intravital microscopy was performed at 15 min post IVH induction on the cremaster muscle of mice to quantify venular leukocyte (WBC) rolling and adhesion, and non-invasive laser Doppler flowmetry (LDF) measured blood perfusion in the murine pelvis microvasculature. Blood samples were collected at 1-hour post-IVH for ELISA and flow cytometry analyses. Immortalized human endothelial cells (HUVEC; n=7 per group) were stimulated with heme or S100A8 for 3 hours.

HEM mice demonstrated significantly increased plasma heme (P<0.0001) and cell-free hemoglobin (P<0.001), in association with significantly decreased plasma haptoglobin (P<0.05), compared to CON mice, thereby confirming the occurrence of IVH. Furthermore, HEM mice exhibited significantly increased plasma concentrations of the S100A8 alarmin (P<0.001) and IL1- $\beta$  (P<0.001), as well as augmentations (P<0.001) in plasma TNF- $\alpha$  and IL-6 levels. Flow cytometry was used to measure active Casp-1 in neutrophils and monocytes of mice using the FAM-FLICA probe. FLICA staining was significantly higher in the neutrophils (P<0.05) and monocytes (P<0.05) of HEM mice, compared to CON mice, implying Casp-1 activation in these cell subsets. WBC-endothelium interactions are a hallmark of vaso-occlusion in SCD. HEM mice exhibited elevated venular WBC rolling and adhesion to the endothelium, compared to CON mice (P<0.001), as previously shown (Almeida et al., 2015; PMID: 26019278). In addition, IVH significantly reduced the velocity of microvascular blood flow in mice (P<0.001), and impaired perfusion (P<0.001). To address the role of IVH-induced Casp-1 activation in microvascular dynamics, mice received i.p. administrations of the Casp-1 inhibitor, YVAD, at 1 hour prior to induction of IVH, or not, and were subjected to intravital microscopy or LDF. Interestingly, the inhibition of Casp-1 significantly abrogated IVH-induced WBC rolling (P < 0.01) and adhesion to vessel walls (P<0.05) in HEM mice and significantly improved microvascular blood perfusion and flow velocity (P<0.05), suggesting a role for Casp-1 activation in the WBC-endothelium and occlusive interactions observed (See Figure). We then evaluated how heme and S100A8 may induce endothelial cell activation, as these DAMPs were found elevated in the plasma of HEM mice. As expected, compared to unstimulated HUVEC, heme induced endothelial cell activation in vitro, as shown by higher expressions of ICAM-1 (P<0.05), VCAM-1 (P<0.01) and E-selectin (P<0.01), and increased Casp-1 activity (P<0.01). In turn, S100A8 alone significantly elevated ICAM-1 (P<0.05) and E-selectin (P<0.01) expressions on HUVEC, as well as IL-1 $\beta$  release (P<0.001), however no significant increase in Casp-1 activity was observed. HUVEC, when pre-treated with YVAD, displayed a significant reduction in S100A8-induced E-selectin expression (P<0.05), but neither ICAM-1 nor VCAM-1 expression were significantly decreased. In contrast, no changes in the expressions of these adhesion molecules were observed in heme-stimulated cells after YVAD treatment.

Taken together, these findings suggest that targeting caspase-1 activation and its associated pathways may represent a potential therapeutic intervention to mitigate the adverse inflammatory and microvascular effects of IVH, a disease mechanism that occurs in severe hemolytic anemias such as SCD.

Session 101

#### POSTER ABSTRACTS

**Disclosures Gotardo:** Novartis Pharma AG: Other: Post Doctoral Fellowship Grant. **Costa:** Pfizer: Consultancy; Novartis Pharma AG: Honoraria. **Conran:** Novartis Pharma AG: Research Funding.



Figure. Inhibition of caspase-1 prevents intravascular hemolysis-induced alterations in microvascular perfusion and leukocyte recruitment. C57BL/6 mice were treated i.p. with a caspase-1 inhibitor YVAD (8mg/kg) or vehicle DMSO (0.5 % in sterile PBS) at 1 hour before induction of hemolysis (150 µl water i.v., HEM), or not (i.v. saline; CON). At 15 min post-hemolysis induction, (A) non-invasive laser Doppler flowmetry was used to measure blood flow velocity and (B) perfusion in the skin microvasculature of mice (pelvic limb), and leukocyte (WBC) recruitment was quantified in 6-8 venules per murine cremaster muscle. Graphs depict (C) WBC rolling and (D) adhesion in venules of HEM and CON mice treated with YVAD or DMSO (n=3/group; circles represent values for each venule). (E) Representative images from cremaster venules of mice. White stars represent adherent WBCs; grey arrows indicate the direction of blood flow. Scale bar, 20 µm, magnification, 63X.

Figure 1

https://doi.org/10.1182/blood-2023-189048





**Trinity College Dublin** Coláiste na Tríonóide, Baile Átha Cliath The University of Dublin

# Sandwich Scholarship Abroad (SWE)

# Investigation of metabolic reprograming in haem-induced proinflammatory responses in S100A8-primed human macrophages

Pamela Lara Brito, MSc

2023

Supervisor Ireland – Trinity College Dublin: Prof. Aisling Dunne, PhD Supervisor Brazil - UNICAMP: Prof. Nicola A Conran Zorzetto, PhD



# Summary

Intravascular haemolysis, or the destruction of red blood cells (RBCs) in blood vessels, is associated with numerous disorders including acquired haemolytic anaemia, sickle cell disease, preeclampsia, malaria and infections. During haemolysis, the potent damage-associated molecular pattern (DAMP), haem, is released into the circulation and, if not adequately cleared, can activate innate immune cell and inflammatory responses. In a previous collaboration between our research groups at the University of Campinas (UC) and Trinity College Dublin (TCD), we showed that haem positively regulates the expression of the S100A8 alarmin by human macrophages, which then primes these cells for NLRP3-inflammasome activation, thereby amplifying the effects of haem on interleukin (IL)-1 $\beta$  release. Emerging evidences continues to unravel the mechanisms by which haem and S100A8 govern macrophage functionality and inflammatory responses, however the effects of these molecules on cell metabolism remain unclear. Therefore, the aim of this study is to test whether the DAMPs derived from haemolysis, specifically haem, along with the alarmin S100A8, which is upregulated during haemolysis, could potentially exert influence on the immunometabolic pathways of macrophages. To achieve this, we explored several different factors that can influence macrophage function, activation and metabolism. Findings from our study reveal intriguing interactions between S100A8 priming, glycolytic markers, metabolic reprogramming, and mitochondrial dynamics, particularly in the context of haem exposure.

The initial experiments were assessed to evaluate, in a time dependent manner, the effects of haem on the pro-inflammatory activation of primary human macrophages. While no effects on TNF-a production were observed after 3 hours of haem stimulus, a significant increase in this cytokine production was detected at later time points, with the highest concentration observed after 24 hours. Subsequently, we investigated the potential links between haem and macrophage metabolism. Glycolysis, a key metabolic pathway associated with inflammation, was assessed by observing the expression of glycolytic markers such as GLUT1 and HK-2. The results indicated subtle changes in the expressions of these markers in macrophages, in response to haem stimulation, particularly at specific time points and concentrations. Moreover, the expression of HIF-1a, a transcription factor known to regulate glycolytic gene expression, was found to be slightly upregulated following haem stimulation, particularly at higher concentrations and longer incubation times. However, due to the limited number of samples analysed, further experiments are required to validate these results conclusively. The impact of haem on macrophage metabolism was further explored using functional assays. Measurements

of extracellular acidification rate (ECAR) and oxygen consumption rate (OCR) indicated that haem stimulation had varying effects on glycolysis and oxidative phosphorylation, depending on the concentration and incubation time. These observations underscore the complex relationship between haem exposure and macrophage metabolic reprogramming. Intriguingly, haem also induced changes in mitochondrial dynamics, as assessed by confocal microscopy, which showed mitochondrial fragmentation, suggesting mitochondrial fission. In addition to increasing mitochondrial reactive oxygen species (mROS), haem time dependently induced the expression of mitochondrial fission factor (MFF), a protein involved in regulating mitochondrial fission. This suggests that haem might influence macrophage mitochondrial dynamics, potentially impacting cellular function.

As a secondary part of this study, we aimed to establish the effects of alarmin S100A8 on macrophages bioenergetics. Using different stimulation times, our results demonstrated that a brief exposure of macrophages to S100A8 led to a decrease in the expression of glycolytic markers GLUT1 and HK-2 at the protein level. While a trend towards enhanced glycolysis was observed, a relative reduction in basal respiration of macrophages was detected after a short S100A8 stimulation. Furthermore, our observations revealed a significant early increase in mROS at 3 hours of S100A8 stimulus. However, the mechanism underlying the response of reduced glycolytic marker expression and mitochondrial dynamics, in response to S100A8, remains to be fully elucidated. In contrast to the initial observations for brief S100A8 exposure, prolonged stimulation resulted in the upregulation of key glycolytic markers GLUT1 and HK-2 at the protein level. Concurrently, preliminary RT-PCR analysis revealed relative increased expressions of genes encoding PFKFB3 and HIF-1a, indicating that S100A8 exposure induces a potential bioenergetic shift. This was further accompanied by a tendency towards glycolysis and a decrease in respiratory capacity (max OCR). This finding suggests that S100A8 has the potential to modulate glycolytic metabolism in macrophages, possibly contributing to alterations in cellular energy production and function.

Based on the above findings, the third aim of this study was to assess the metabolic response of macrophages upon S100A8 priming and haem stimulation. Importantly, S100A8 priming appeared to further potentiate the effects of haem on glycolytic markers, notably HK-2. Furthermore, our study indicated that S100A8 priming of macrophages was associated with higher basal glycolysis, without significantly amplifying the glycolytic capacity profile. Additionally, a trend toward increased maximal respiration was noted, suggesting a possible link between S100A8 priming and macrophage respiratory capacity. Of particular interest,

S100A8 priming potentialized the generation of mROS induced by haem, suggesting that S100A8 priming might potentialize mitochondrial stress or the dysfunction induced by haem.

Collectively, the findings of this work suggest that haem, which has diverse effects upon macrophage cytokine production, may induce glycolysis and mitochondrial dynamics, and that effects may be, not only amplified, but also reprogrammed by the alarmin S100A8. While further research is needed to fully elucidate the underlying mechanisms, including inflammasome activation, this study offers insights into the mechanisms underlying haemolysis-derived DAMPs on cellular metabolism and activation.

# **Table of Contents**

1. STATEMENT OF THE PROBLEM	14
2. PROJECT AIMS	17
2.1 Specific aims 17	
	17
<b>3.</b> METHODS	17
3.1. SUBJECTS AND ETHICAL ASPECTS OF THE STUDY 17	
3.2. Isolation of monocytes and differentiation of macrophages 18	FROM PMBC
3.3. HAEM PREPARATION AND IN VITRO TREATMENTS 19	
3.4. QUANTIFICATION OF CYTOKINE BY ELISA ( <i>ENZYME-LINKED IMMUNOSC</i> 19	ORBENT ASSAY)
3.5. REAL-TIME QUANTITATIVE POLYMERASE CHAIN REACTION (QRT-PCR)	20
3.5.1. RNA extraction 20	
3.5.2. cDNA synthesis 20	
3.5.3. RT-PCR Protocol 20	
3.6. Flow cytometry 21	
3.7. WESTERN BLOTTING 22	
3.8. SEAHORSE ANALYSIS TO ASSESS CHANGES IN GLYCOLYSIS/OXPHOS.	23
3.9. Confocal Imaging of mitochondria 23	
3.10.MITOSOX STAINING FOR ROS 24	
3.11.STATISTICAL ANALYSIS 24	
4. RESULTS	24
4.1. HAEM DRIVES TNF-a RELEASE IN PRIMARY HUMAN MACROPHAGES IN DOS	E-DEPENDENT
manner 24	
4.2. HAEM PROMOTES MODERATE CHANGES OF MARKERS OF GLYCOLYSIS	25
4.3. The bioenergetic profile of primary human macrophages is not	ALTERED BY
haem 28	
4.4. HAEM ENHANCES MITOCHONDRIAL FISSION FACTOR AND MITOCHOND	RIAL ROS IN
PRIMARY HUMAN MACROPHAGES 31	
4.5. S100A8 ALARMIN MODERATELY MODULATES GLYCOLYTIC MARKERS EX	<b>KPRESSION ON</b>
PRIMARY HUMAN MACROPHAGES 35	

4.6. EFFECTS OF S100A8 ALARMIN ON THE BIOENERGETIC PROFILE OF PRIMARY HUMAN MACROPHAGES 37

4.7. S100A8 induces mitochondrial ROS, but has no effect on the mitochondrialshape of primary human macrophages40

4.8. S100A8 priming potentializes mitochondrial ROS generation induced by haem 42

4.9. EFFECTS OF S100A8 PRIMING AND HAEM STIMULATION ON GLYCOLYTIC MARKERS IN PRIMARY HUMAN MACROPHAGES 44

4.10.EFFECTS OF S100A8 PRIMING ON THE METABOLIC PROFILE OF HAEM-STIMULATED MACROPHAGES 46

5.	DISCUSSION	)
6.	REFERENCES	5

# **Table of Figures**

- FIGURE 1. HAEM DRIVES TNF-A PRODUCTION IN PRIMARY HUMAN MACROPHAGES. THE RELEASE OF TNF-a IN CELL SUPERNATANTS WAS ANALYSED BY ELISA (N = 4 - 7, N = 1), AFTER (A) 3 HOURS, (B) 6 HOURS, AND (C) 24 HOURS OF HAEM INCUBATION. ALL DATA ARE REPRESENTED AS MEAN  $\pm$  SEM. DATA WAS ANALYSED USING ONE-WAY ANOVA WITH DUNN'S (B) OR BONFERRONI'S (A-C) POST-TEST. \*\* P 0.01, \*\*\*\* P  $\leq$  0.0001......25

- Figure 4. Effects of haem on rates of glycolysis in primary human macrophages. Primary human macrophages (1 x 10<sup>6</sup> cells/mL) were stimulated with 50  $\mu$ M haem for 3 hours, or 25  $\mu$ M for an extended time course of 6 h and 24 hours. (A) Bioenergetic profiles from one representative experiment depicting extracellular acidification (ECAR) measurements over time, before and after injections of oligomycin (1mM), FCCP (1mM), antimycin A (500 nM)/Rotenone (500

- Figure 13. Effects of S100A8 on Respiration rates in primary human macrophages. PRIMARY HUMAN MACROPHAGES (1 x  $10^6$  cells/mL) were stimulated with Recombinant S100A8 (1 µg/mL) for 6 hours or 24 hours. (A) Bioenergetic profiles FROM one Representative experiment depicting oxygen consumption (OCR) Measurements over time, before and after the injections of oligomycin (1 mM), FCCP (1 mM), antimycin A (500 nM), and rotenone (500 nM), and 2-DG (25 mM), Post stimulation with haem. (B-C) Bar graphs demonstrating basal respiration and max respiration. Data are represented as mean ± SEM (N=4, N=2). Data were Analysed using repeated measure One Way ANOVA with Dunnett's Test. P>0.05.
- Figure 14. Relationship between glycolytic profile and oxidative phosphorylation in primary human macrophages after S100A8 incubation. Primary human macrophages (1 x 10<sup>6</sup> cells/ml) were stimulated with recombinant human S100A8 (1  $\mu$ g/mL) for 6 hours or 24 hours. Bar graph demonstrating ratio of basal glycolysis (ECAR): basal respiration (OCR) after haem stimulation. All data are represented as mean ± SEM (N = 4, N = 2). Data were analysed using repeated measure One Way ANOVA with Dunnett's Test. P>0.05.......40
- Figure 15. S100A8 drives mitochondrial ROS production in primary human macrophages. Primary human macrophages (5 x  $10^5$  cells/mL) were stimulated with recombinant human S100A8 (1 µg/mL) for 3 hours or 6 hours. Cells were stained with MitoSox<sup>TM</sup> Red to assess mitochondrial ROS production and analysed by flow cytometry. (A) Bar graph illustrates the mean  $\pm$  SEM

- Figure 16. Mitochondrial fission and fusion upon S100A8 stimulation. Primary human macrophages (1 x 10<sup>6</sup> cells/ml) were stimulated with recombinant human S100A8 (1  $\mu$ G/mL) for 3 hours or 6 hours. Cells were stained with Mitotracker<sup>TM</sup> (red) to assess mitochondrial morphology, and counterstained with Hoechst (blue) to show nuclei. Cells were imaged using a Leica SP8 scanning confocal microscope. (A) Representative images of unstimulated (UT) and haem stimulated macrophages at 3 hours or 6 hours. (B-C) Shape parameters of mitochondria were quantified using Cell Profiler software (N = 2, N = 1). Data were analysed using one-way ANOVA with Dunnett's test. P>0.05.......42
- Figure 18. Effects of S100A8 priming and Haem stimulation on the expression of glycolytic markers in primary human macrophages. Primary human macrophages (5 x 10<sup>5</sup> cells/mL) were stimulated with recombinant human S100A8 (1 mg/mL) for 3 h, 6 h or 24 hours alone or followed by haem for another 3 h (A and C; D and F) or co-incubated for 6 hours with 50  $\mu$ M haem (B, E) and then assessed for GLUT1 and Hexokinase-2 expressions in whole cell lysates by western blot (N=4, N=2). All data are represented as mean ± SEM and analysed using One Way ANOVA with Dunnett's post-test. \*P>0.05; each image above a

- Figure 19. Effects of S100A8 priming and haem stimulation on rates of glycolysis in primary human macrophages. Primary human macrophages (1 x 10<sup>6</sup> cells/mL) were stimulated with recombinant human S100A8 (1  $\mu$ g/mL) for 24 hours alone or followed by haem (25  $\mu$ M) for 6 hours. (A and D) Bioenergetic profiles from one representative experiment depicting extracellular acidification (ECAR; A-C) and oxygen consumption (OCR; D-F) measurements over time, before and after injections of oligomycin (1mM), FCCP (1mM), antimycin A (500 nM)/Rotenone (500 nM), and 2-DG (25 mM) post stimulation. Bar graphs demonstrating basal glycolysis(B), max glycolysis (C), basal respiration (E), and max respiration (F). All data are represented as mean ± SEM (N = 4, N =2) Data were analysed using RM One Way ANOVA with Dunnett's Test. P>0.05. 46
- FIGURE 20. EFFECTS OF S100A8 PRIMING AND HAEM STIMULATION ON RATES OF GLYCOLYSIS IN PRIMARY HUMAN MACROPHAGES. PRIMARY HUMAN MACROPHAGES (1 x 10<sup>6</sup> CELLS/ML) WERE STIMULATED WITH RECOMBINANT HUMAN S100A8 (1  $\mu$ G/ML) FOR 24 HOURS ALONE OR FOLLOWED BY HAEM (50  $\mu$ M) FOR3 HOURS. (A AND D) BIOENERGETIC PROFILES FROM ONE REPRESENTATIVE EXPERIMENT DEPICTING EXTRACELLULAR ACIDIFICATION (ECAR; A-C) AND OXYGEN CONSUMPTION (OCR; D-F) MEASUREMENTS OVER TIME, BEFORE AND AFTER INJECTIONS OF OLIGOMYCIN (1MM), FCCP (1MM), ANTIMYCIN A (500 NM)/ROTENONE (500 NM), AND 2-DG (25 MM) POST STIMULATION. BAR GRAPHS DEMONSTRATING BASAL GLYCOLYSIS(B), MAX GLYCOLYSIS (C), BASAL RESPIRATION (E), AND MAX RESPIRATION (F). ALL DATA ARE REPRESENTED AS MEAN ± SEM (N = 4, N =2) DATA WERE ANALYSED USING RM ONE WAY ANOVA WITH DUNNETT'S TEST. P>0.05. 48

# **Table of Tables**

TABLE 1. GENE PRIMERS SEQUENCIES.	21
TABLE 2. THERMAL CYCLING PARAMETERS FOR ITAQ UNIVERSAL SYBF	GREEN REAL-TIME
PCR.	21

#### 1. Statement of the Problem

Haemolytic anaemia is characterized by a decrease in the survival and, therefore, the number of circulating red blood cells (RBCs), even when the bone marrow compensates this reduction with an increase in the production of erythrocytes [1-3]. Intravascular haemolysis occurs in numerous pathological conditions, including in acquired haemolytic anaemias and sickle cell disease, as well as during some transfusion reactions, preeclampsia, liver cirrhosis, lupus erythromatosus and infections, such as those caused by malaria or Clostridium perfringens [4, 5]. In addition to etiology-specific symptoms, these disorders can share a series of complications related to the haemolytic condition, such as pulmonary hypertension, skin ulcers on the legs and priapism [4, 6-12].

The haemolytic process, recognized as the destruction of red blood cells (haemolysis), can occur both in the extravascular compartment, via their removal by macrophages present in the liver and spleen, and in the intravascular compartment. Intravascular haemolysis results in the immediate release of erythrocyte components, including haemoglobin (Hb) and the haem molecule into the circulation. Despite the existence of rapid protection mechanisms, such as those provided by clearing proteins (e.g. haptoglogin, haemopexin and ferritin), which eliminate the products of haemolysis (Hb, haem and iron, respectively) [13, 14], the exacerbated destruction of RBCs in disorders such as sickle cell disease [15] leads to the saturation of this protective system, with the consequent accumulation of cell-free Hb and haem. Another immediate effect of intravascular haemolysis and the cellular release of free Hb is the consequent consumption of nitric oxide (NO) in the blood vessel [16, 17]. The reaction of cell-free Hb with decreases NO bioavailability, leading to endothelial activation and vascular inflammation, in addition to incurring the production of nitrite and oxidized Hb species, such as ferric (HbFe<sup>3+</sup>) and ferrous (HbFe<sup>2+</sup>) haemoglobins that can release haem molecules into the circulation [18, 19].

The lipophilic properties of haem mean that this molecule penetrates through biological membranes easily and oxidizes unsaturated fatty acids, resulting in the production of reactive oxygen species (ROS), leading to inflammation and cellular and tissue damage [20, 21], as well as vascular injury [22-24]. In addition to its direct cytotoxic effects, free haem is recognised as a damage-associated molecular pattern (DAMP) that induces the activation of innate immune cells and non-haematopoietic cells. Studies have shown that this molecule binds and activates

toll like receptor 4 (TLR4), inducing the expression of adhesion molecules such as ICAM-1, VCAM-1, E-selectin and P-selectin on endothelial cells and stimulating cellular activation and the release of pro-inflammatory cytokines, interleukin (IL) 1 $\beta$  and IL-18, via inflammasome activation [25-28]. In neutrophils, haem activates adhesion molecules and promotes the formation of extracellular traps (neutrophil extracellular traps, NETs), which can trigger the chemotaxis of these cells, via adhesion to activated endothelium, and their migration to tissues, resulting in vascular and tissue injury [25-28]. A previous study by the group at UNICAMP, Brazil demonstrated that the induction of acute haemolytic processes, *in vivo*, results in vascular inflammatory processes and leukocyte recruitment in the microvasculature, similar to those observed in mice with sickle cell anaemia [29].

Inflammasomes are multiprotein and multimeric intracellular complexes, formed in response to an inflammatory stimulus, that process IL-1 $\beta$  and IL-18 cytokines via a caspasedependent mechanism. These protein assemblies consist of an intracellular Pattern Recognizer Receptor (PRR) such as a NLR (NOD-like receptor), an adapter protein ASC (apoptosisassociated speck-like protein) and an effector domain (caspase-1) [30]. The NLRP3 Inflammasome is activated by several DAMPs, such as ATP, and uric acid crystals. Activation of NLRP3 by haem, with subsequent production of IL-1 $\beta$ , has been described in macrophages pre-sensitized with lipopolysaccharide (LPS), via a mechanism dependent on mitochondrial reactive oxygen species (mROS) and NADPH oxidase 2 (NOX2) [31]. NLRP3 inflammasome assembly is controlled at several stages and the priming step of NLRP3 inflammasome activation, associated with increased NLRP3 gene expression, can be activated by several sterile priming stimuli, such as serum amyloid A (SAA) and oxidised low density lipoprotein (oxLDL) [32]. One such sterile priming protein is S100A8, belonging to the S100 myeloid-cell derived family of proteins [33]. After its release from activated neutrophils and monocytes, S100A8 can activate PRRs such as TLR4 and RAGE (receptor for advanced glycation end products) [34-36], inducing inflammatory responses. Simard and colleagues [37] showed that stimulation of peripheral blood mononuclear cells (PMBCs) by S100A8, and also by S100A9, leads to the secretion of IL-1 $\beta$ , IL-6 and TNF- $\alpha$ , among other chemokines, in a process linked to the generation of ROS and dependent on NF-kb, with formation of the NLRP3 inflammasome. Research from Aisling Dunne's group at Trinity College Dublin shows that crystals of cholesterol and of basic calcium phosphate (BCP; produced during osteoarthritis) induce the production of S100A8 by immune cells [38, 39]. Importantly, a collaboration between our two research groups (UNICAMP, Brazil and Trinity College Dublin) showed that haem induces the

expression of S100A8 in human macrophages and that, importantly, haem greatly amplifies S100A8-driven NLRP3-inflammasome-mediated IL-1 $\beta$  secretion from these cells [40].

Recent studies have shown that the activation of inflammasomes in macrophages stimulated by Gram-negative bacteria-derived LPS can be coordinated by several regulatory factors of the glycolytic pathway, such as glucose transporter 1 (GLUT1), Hexokinase1 (HK1) and hypoxia-inducible factor 1-alpha (HIF-1a)[41]. GLUT1 is one of the most abundant receptors on macrophages and is upregulated under inflammatory conditions, leading to changes in the cellular glycolytic phenotype [42]. In addition to activating the NLRP3 inflammasome, GLUT1 can also induce the priming step that is necessary for inflammasome assembly by increasing the gene expressions of NLPR3 and of pro-IL-1 $\beta$  [42]. Hexokinase1 (HK1), expressed in most tissues, is an enzyme that promotes the phosphorylation of glucose to produce glucose-6-phosphate, the first and limiting step of glycolysis [43]. The interaction of HK1 with the NLRP3 inflammasome in the mitochondrial outer membrane results in the activation of the complex; furthermore, the absence of HK1 in macrophages leads to the inhibition of caspase-1 activity and attenuates the release of IL-1β. HK1 expression is induced by ramicin mechanistic target protein complex 1 (mTORC1), one of the major regulators of autophagy. The effects of mTORC1 on caspase-1 activation and pro-IL-1ß maturation indicate its involvement in inflammasome formation [44]. mTOR is the main metabolic regulator that detects intracellular and extracellular signalling and controls the metabolism and activation of macrophages [45]. While mTORC1 activation is regulated by a variety of growth factors and amino acids, studies have shown that pro-inflammatory cytokines IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  amplify the activation of mTORC1 [46]. Additionally, oxidation of the S100A9 protein by NADPH oxidase 1 activity (NOX1) facilitates its interaction with mTORC1, inducing its activation [47].

Finally, a major immunometabolite that can accumulate in macrophages in response to inflammatory stimuli and consequent disturbance of Kreb's cycle is itaconate, as a result of immunoresponsive gene 1 (Irg1) upregulation. Itaconate has numerous roles and can inhibit glycolysis, activate anti-inflammatory transcription factors such as NrF2 and inhibit the NLRP3 inflammasome [48]. Macrophages have a huge influence on erythropoiesis, due to their formation of macrophage-erythroblastic islands that constitute a specialized microenvironment for erythropoiesis [49]. Importantly, itaconate has been found to inhibit haem synthesis, a key step in erythropoiesis, and therefore may play a role in remodelling cellular metabolism in erythroid precursors and in turn exacerbate inflammatory anaemia [50].

Despite evidence of the participation of mTORC1/HK-1-dependent upregulation of glycolysis in inflammasome activation, the mechanism by which glycolysis participates in the formation of inflammasomes in response to DAMPs derived from the haemolytic process, as well as in immune cells primed by S100A8 (released during haemolysis), have not yet been explored.

# 2. Project Aims

To investigate a role for immunometabolism in immune responses to haemolytic processes in innate immune cells, in vitro and in vivo.

# 2.1. Specific aims

- In vitro: Determine whether haem-induced inflammasome formation modulates glycolysis-regulating enzymes and accelerates glycolysis in human macrophages.
- In vitro: Determine whether haem stimulation of S100A8-primed human macrophages accelerates glycolysis and modulates glycolysis-regulating enzymes.
- In vitro: Evaluate the effects of the inhibition of glycolysis and GLUT1 activation on inflammatory responses stimulated by haem in S100A8-primed/unprimed macrophages.
- In vivo: Investigate, in an animal model of acute hemolysis, the effects of hemolysis on glycolytic pathways.

#### 3. Methods

## 3.1. Subjects and ethical aspects of the study

In this study, leukocyte enriched buffy coats from 32 anonymous health donors, over 18 years of age, both sexes, were obtained with permission of the Irish Blood Transfusion Service (IBTS), St. James's Hospital, Dublin. All individuals included in this study provided informed written consent to the IBTS for their blood to be used for research purposes. The ethics approvals are in place in the Professor Dunne's laboratory.

#### **3.2.** Isolation of monocytes and differentiation of macrophages from PMBC

The blood from each pack content was diluted 1:2 with sterile PBS and centrifuged at 1250 *x g* for 10 minutes at room temperature. The buffy coat layer containing leukocytes was removed, and diluted with sterile PBS, and 25 mL of diluted buffy coat were layered over 17.5 mL Lymphoprep<sup>TM</sup> (Axis-Shield/Serumwerk). Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated by density gradient centrifugation (800 *x g* for 20 minutes, at 20°C), and carefully removed, washed in sterile PBS and centrifuged for 10 minutes at 650 *x g* at 20°C. The supernatant was discarded, and the PBMC pellet was re-suspended in sterile PBS and washed for 10 minutes at 300 *x g*. The supernatant was discarded and the PBMC pellet was re-suspended in 50 mL of complete RPMI (2 mM L-glutamine, 10% foetal bovine serum [FBS], 100 U/mL penicillin and 100  $\mu$ g/mL streptomycin) for cell counting assessed with trypan blue (1:40 dilution). Viable cells were counted on a light microscope using a haemocytometer (Hawksley or Hycor Glasstic slide, Kova).

For CD14<sup>+</sup> monocyte isolation, a total of 300 x10<sup>6</sup> PBMCs were pelleted and washed in MACS buffer (2% FBS, 2 mM EDTA in sterile PBS) at 300 *x g* for 5 minutes at room temperature. The supernatant was discarded, and the pellets was re-suspended in MACS buffer at 1 x 10<sup>8</sup> cells/mL and transferred to a 12 x 75 mm tube for anti-CD14 biotin incubation (10  $\mu$ L per 100  $\mu$ L cells) for 10 minutes at room temperature. The cells were washed in 4 mL of MACS buffer for 5 minutes at 300 *x g*. The supernatant was discarded and pellet cell was resuspended in the original volume of MACS buffer for incubation with MagniSort<sup>TM</sup> (Invitrogen) positive selection beads (15  $\mu$ L per 100  $\mu$ L cells) at room temperature for 10 minutes. The MACS buffer volume was then adjusted to 2.5 mL and the tube placed inside the magnetic field of a cell sorter magnet (EasySep<sup>TM</sup> - STEMCELL Technology) for 5 minutes. The negative fraction was the poured off by inverting the tube while held inside the magnet and the remaining positive cells were re-suspended in 2.5 mL of MACS buffer for another 5 minutes incubation. After complete three 5 minutes washing steps, the CD14<sup>+</sup> monocyte fraction was re-suspended in complete RPMI and counted with trypan blue.

CD14<sup>+</sup> monocytes were plated at a concentration of 1 x 10<sup>6</sup> cells/mL or 5 x 10<sup>5</sup> cells/mL in complete RPMI containing recombinant human macrophage colony-stimulating factor (M-CSF – Mylteni Biotech) at a final concentration of 50 ng/mL. Cell differentiation was carried out at 37°C in an atmosphere of 95% humidity and 5% CO<sub>2</sub> for 6 days, with replacement of RPMI (containing M-CSF) every 3 days.

#### 3.3. Haem preparation and in vitro treatments

Haem (Sigma-Aldrich) was solubilized in sterile 100 mM NaOH, vortexed for 5 minutes and complete RPMI was added to give a 5 mM haem stock concentration. After another 5 minutes vortex, the solution was filtered (0.22  $\mu$ m) and the concentration was adjusted with RPMI to each stimulus: 5  $\mu$ M, 10  $\mu$ M, 25  $\mu$ M, 50  $\mu$ M and 100  $\mu$ M. Differentiated PMBC macrophages were incubated or not (Unstimulated) for 3 h, 6 h or 24 hours with haem. Recombinant human S100A8 (R&D System) was reconstitute in sterile PBS at 500  $\mu$ g/mL kept at -20°C. For macrophages stimulation, S100A8 was further diluted in complete RPMI to a final concentration of 1  $\mu$ g/mL, and incubated for 6 h or 24 hours. As a positive control, cells were stimulated, or not, with 100 ng/mL LPS (InvivoGen) for 6h or 24 hours. In order to exclude possible contamination with LPS, the LPS neutralizer, polymyxin B (10  $\mu$ g/mL; Sigma-Aldrich) was used in assays where LPS was not used. In co-stimulation, cells were primed with S100A8 for 24 hours, followed by 50  $\mu$ M haem for another 3 hours or 25  $\mu$ M haem for another 6 hours. In some experiments, S100A8 and haem were incubated at the same time for 6 hours.

## **3.4.** Quantification of cytokine by ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*)

The concentration of human TNF-a in culture supernatant was quantified by ELISA kit (Invitrogen) according to the manufacturer's protocol. Briefly, a high-binding 96-well plate (Greiner Bio-one) was coated with capture antibody diluted in coating buffer for 12 hours at 4°C. The plate was then washed once with ELISA wash buffer solution, and non-specific binding sites were blocked with assay diluent for 1 hour at room temperature. After 4 washes, the supernatant samples were loaded into the wells in triplicate, as well as a standard curve of serial diluted recombinant TNF-a. Samples were incubated overnight at 4°C. After washing, detection antibody was added into each well, including blank wells, and incubated for 2 hours at room temperature. The well content was discarded, and the plate was thoroughly washed and dried for the horseradish-peroxidase (HRP) conjugated to streptavidin incubation in the dark, at room temperature for 30 minutes. Wells were washed and the substrate tetramethylbenzidine (TMB) was added to each well and the reaction was determinate at 450nm using a microplate reader, and a standard curve was generated and used to determine the concentration of cytokine in each sample.

## 3.5. Real-time Quantitative Polymerase Chain Reaction (qRT-PCR)

## 3.5.1. RNA extraction

The RNA was isolated using the High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche), according to the manufacturer's instructions. For the PCR assay, CD14<sup>+</sup> monocytes were plated at density 1 x 10<sup>6</sup> cells in a 12-well plate (well-area  $3.5 \text{ cm}^2$ ). After stimuli, supernatants were removed and cells were washed once with PBS before the addition of 400 µL of lysis/-binding buffer and 200 µL of PBS per well. Plates were kept at -20°C until RNA extraction. The lysates were transferred to a High Pure Filter Tube that was inserted into a collection tube. Samples were centrifuged at 8,000 *x g* for 15 seconds. The flow through liquid was discarded and DNase I solution was incubated for 15 minutes at room temperature. The filter tubes were washed with Wash Buffer I and centrifuged at 8,000 *x g* for 15 seconds. The flow through liquid was discarded at 8,000 *x g* for 15 seconds. The flow through liquid was discarded at 8,000 *x g* for 15 seconds. The flow-through liquid was discarded and the filter tubes were washed with Wash Buffer I and centrifuged at 8,000 *x g* for 2 minutes. The Collection Tubes were discarded, and the Filter Tubes were placed into sterile, RNase-free 1.5 ml microcentrifuge tubes. RNA was eluted with Elution Buffer from the filter tubes at 8,000 *x g* for 1 minute. The concentration of eluted RNA in each sample was determined using a NanoDrop 2000c UV-Vis Spectrophotometer and then equalised by the addition of Elution Buffer, where necessary.

## 3.5.2. cDNA synthesis

cDNA synthesis was carried out using the High-capacity cDNA reverse transcription kit (Applied Biosystems). A 2X Reverse Transcription (RT) Master Mix was prepared per sample as follow: 2  $\mu$ L of 10X RT Buffer; 0.8  $\mu$ L of 25X dNTP (100 mM); 2  $\mu$ L of 10X RT Random primers; 1  $\mu$ L of Multiscribe Reverse Transcriptase. A total of 14.2  $\mu$ L of RNA was added to 2X RT Master Mix and the reverse transcription reaction was performed at: Step 1 = 23°C for 10 minutes; Step 2 = 37°C for 120 minutes; Step 3 = 85°C for 5 minutes; Step 2 = 4°C for indefinitely (PTC-200 Peltier Thermal Cycler).

#### **3.5.3. RT-PCR Protocol**

The analysis of gene expression by real-time PCR for *GLUT1*, *HK2*, *HIF1a*, *PFKFB3*, *GAPDH*, *PKM2*, and  $\beta$ -actin (Merk) was carried out using the iTaq<sup>TM</sup> Universal SYBR Green Supermix (Bio-Rad) and oligonucleotide primers (detailed in Table 1). Reactions were made up in a 96-well PCR plate containing 0.5 µL of Forward Primer; 0.5 µL of Reverse Primer; 4

 $\mu$ L of iTaq<sup>TM</sup> SYBR Green Supermix; 4  $\mu$ L of RNase/DNase-free water; and 1  $\mu$ L of cDNA. PCR reaction (Table 2) was performed sing the BioRad CFX Touch Real-Time PCR detection system. For each sample duplicates, mRNA concentration was normalised using the crossing threshold of the housekeeping gene Beta-actin. Gene expression, relative to untreated samples, was determined using the 2- $\Delta\Delta$ Ct algorithm.

Gene	Forward primer sequence	Reverse primer sequence		
GLUT1	GAACTCTTCAGCCAGGGTCC	ACCACACAGTTGCTCCACAT		
HK2	TTCTTGTCTCAGATTGAGAGTG AC	TTGCAGGATGGCTCGGACTTG		
HIF1a	GAAACTTCTGGATGCTGGTGAT	GCAATTCATCTGTGCTTTCATGT		
	TT	СА		
PFKFB 3	CCATGAAAGTCCGGAAGCAATG	GCTTTTGACATCTCTCAAGGCAG		
GAPDH	ACAGTTGCCATGTAGACC	TTTTTGGTTGAGCACAGG		
РКМ2	ATGTTGATATGGTGTTTTGCG	ATTTCATCAAACCTCCGAAC		
β-actin	GGACTTCGAGCAAGAGATGG	AGCACTGTGTTGGCGTACAG		

Table 1. Gene primers sequencies.

Table 2. Thermal cycling parameters for iTaq Universal SYBR Green real-time PCR.

	Step 1	Step 2	Step 3	Step 4	Step 5	Step 6
Temperature	95	95	60	Plate	72	Go to step 2
(°C)	)5	)5	00	read		
Time (seconds)	600	15	30	-	30	x 40

# **3.6.** Flow cytometry

For flow cytometry, CD14<sup>+</sup> monocytes were plated at a density of 1 x 10<sup>6</sup> cells in a 12well plate (well-area 3.5 cm<sup>2</sup>), or otherwise, at 5 x 10<sup>5</sup> cell in a 24-well plate (well-area 1.9 cm<sup>2</sup>). Immediately after haem exposition, supernatant was removed and macrophages were washed with sterile PBS. Macrophage lifting was performed with pre-warmed Versene solution (Gibco<sup>TM</sup>), followed by incubations at 37°C for 5 minutes. The reaction was interrupted by adding complete RPMI to the wells and cells were collected by gentle scrapping and centrifuged at 300 x g for 5 minutes at room temperature. The supernatant was discarded and cells were resuspended in PBS for staining.

After 6 days of culture, macrophage purity was confirmed using flow cytometry by measuring the expression of CD14 and CD11b on cell surface. For this, cells were harvested with Versene solution as described above. After a wash step, cells were re-suspended with FC Block<sup>TM</sup> reagent (BD®) and incubated for 15 minutes at room temperature. Cells were washed in PBS and pelleted at 300 *x g* for 5. The supernatant was discarded and cells were incubated for 15 minutes at room temperature with anti-CD14-FITC conjugated and anti-CD11b-APC conjugated antibodies. Following extracellular staining, cells were washed in PBS and then fixed with 2% PFA for 15 minutes at room temperature, protected from the light. Cells were washed and re-suspended in FACS buffer (1% BSA in PBS) and acquired on flow cytometer. The analyse was performed using the FlowJo software. A minimum of 10,000 cells per sample were acquired, and identified according to the forward and side scatter characteristics (FSC and SSC) [51].

#### 3.7. Western Blotting

Cultures from 5 x  $10^5$  plated CD14<sup>+</sup> monocytes were used to assess blotting of metabolic proteins GLUT1, HK2, and of mitochondrial fission factor (MFF). After stimulation, macrophages were lysed directly in the plate by adding 1X RIPA buffer, containing 1% of phosphatase inhibitor cocktail 3 (Sigma Aldrich). Lysates were collected and centrifuged at 21,300 *x g* for 5 minutes for supernatant collection, in which was added 5X Laemmli buffer containing 20%  $\beta$ -mercapethanol. Before cooling, samples were boiled at 100°C for 5 minutes and then stored at -20°C until use.

Cell lysates and Ladder Protein Standard (SeeBlue<sup>™</sup> Plus – Invitrogen) were loaded into each well of a prepared 10% acrylamide SDS gel. Proteins were separated by electrophoresis at 120 volts (V) for 2 hours under submersion of 1X Running buffer (200 nM Tris; 1.52 M Glycine; 0.1% SDS). After electrophoreses, the proteins were transferred onto a PVDF membrane by a wet filter paper and sponge transfer sandwich. Prior to assembly, the membrane was activated by submerging in methanol. The protein transfer was carried out in 1x Transfer Buffer (25 mM Tris; 192 M Glycine; 0.02% SDS; 20% Methanol), at 200 milliamperes (mA) for 2 hours.

At the end of transfer, the membranes were incubated with blocking solution (5% nonfatty milk in Tris buffered-saline [200 mM Tis; 150 mM NaCl] containing 0.1% tween 20 – TBST) for 1 hour at room temperature with agitation. Following blocking, the membranes were incubated with primary antibody rabbit anti-HK2, rabbit anti-MFF (Cell Signalling) and rabbit anti-GLUT1 (Invitrogen) solution with agitation, overnight at 4°C, or with anti- $\beta$ -actin conjugated to HRP. The secondary HRP-conjugated antibody (1:10000) was prepared in 3% non-fatty milk solution and the membranes were incubated for 2 hours at room temperature with agitation. The membranes were then washed 5 times for 5 minutes with TBST before developing with freshly prepared ECL solution using Chemi-Luminescent gel documentation system (Bio-Rad). The intensity of protein bands was quantified through densitometric analysis using ImageLab software (Bio-Rad).

#### **3.8.** Seahorse analysis to assess changes in glycolysis/OXPHOS.

Primary human macrophages were cultured from monocytes at  $1 \times 10^6$  cells/ml (25 cm<sup>2</sup>) for 6 days prior to re-seeding at 2 x 10<sup>5</sup> cells/well in a Seahorse 96-well microplate and allowed to rest overnight prior to cell stimulation. Thirty minutes prior to placement into the XF/XFe analyser, cell culture medium was replaced with complete RPMI XF assay medium (Seahorse Biosciences; supplemented with 10 mM glucose, 1 mM sodium pyruvate, 2 mM l-glutamine, and pH adjusted to 7.4) and incubated in a non-CO<sub>2</sub> incubator at 37 °C. Blank wells (XF assay medium only) were prepared without cells for subtracting the background oxygen consumption rate (OCR) and extracellular acidification rate (ECAR) during analysis. Oligomycin (1 mM), carbonyl cyanide-p-trifluoromethoxyphenylhydrazone (FCCP) (1 mM), rotenone (500 nM), and antimycin A (500 nM) and 2-deoxy-d-glucose (2-DG) (25 mM) were prepared in XF assay medium and loaded into the appropriate injection ports on the cartridge plate and incubated for 10 minutes in a non-CO<sub>2</sub> incubator at 37 °C. OCR and ECAR were measured over time with sequential injections of oligomycin, FCCP, rotenone and antimycin A, and 2-DG. Analysis of results was performed using Wave software (Agilent Technologies). The rates of basal glycolysis, max glycolysis, basal respiration, and max respiration were calculated as detailed in the manufacturer's protocol.

# 3.9. Confocal Imaging of mitochondria

CD14<sup>+</sup> monocytes were plated at 1 x 10<sup>6</sup> cells density in 35 mm  $\mu$ -dishes (iBidi) for imaging of mitochondrial morphology changes. Following cell stimulation, supernatant was

removed a fresh media containing 50 nM MitoTracker<sup>™</sup> Red CMXRos (Life technologies) and 5 µg/mL Hoechst (Thermofisher) was added to each dish and cells were maintained for 30 minutes at 37 °C in a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere. Cells were washed 3 times in cold PBS (to protect cell viability) and resuspended in complete RPMI. Cells were imaged immediately using a Leica SP8 scanning confocal microscope and image analysis to morphology with eccentricity and aspect ratios, used as defining parameters in the analysis, were performed using an automated script generated in CellProfiler<sup>™</sup> software.

#### 3.10. MitoSox Staining for ROS

For assessment of mitochondrial ROS, cells were plated at density of  $5 \times 10^5$  in 24-well plate. Following stimulation, the supernatant was removed and cells were incubated with fresh media containing  $5 \mu$ M MitoSox<sup>TM</sup> Red (Invitrogen) for 30 minutes at 37 °C. Cells were washed in PBS, centrifuged at 300 g for 5 minutes and re-suspended in PBS for immediate acquisition on flow cytometer.

## 3.11. Statistical Analysis

All experiments were performed in at least two healthy donors (defined by N), with 2-5 technical replicates run for each experiment (defined by n) depending on the assay type. Data was assessed with one-way ANOVA for the analysis of more than two groups, with Dunnett's post-test (against controls) or Tukey's multiple comparisons test, where applicable. Paired t-test was used for analysis of only two groups. All statistical analysis was performed on GraphPad Prism<sup>TM</sup> 9.00 (GraphPad Software) where p value < 0.05 were deemed significant and denoted by an asterisk. \*p $\leq$ 0.05, \*\*p $\leq$ 0.01, \*\*\*p $\leq$ 0.001, \*\*\*\*p $\leq$ 0.0001.

#### 4. **RESULTS**

# 4.1. Haem drives TNF-a release in primary human macrophages in dose-dependent manner

To determine whether haem stimulates the pro-inflammatory activation of primary human macrophages, haem was tested in four different concentrations in three timeline points. While no effects on TNF-a production were observed in culture of macrophages treated com haem for 3 hours, the production of the cytokine started to increase significantly in macrophages cultures stimulated for 6 hours with the lowest dose of 10  $\mu$ M haem, when compared to untreated cells. The highest cytokine concentration was achieved when macrophages were incubated with haem for a long period of time (24 hours), in which was observed a 5-fold increase in TNF-a release in comparation with unstimulated cells (Figure 1).



Figure 1. Haem drives TNF- $\alpha$  production in primary human macrophages. The release of TNF- $\alpha$  in cell supernatants was analysed by ELISA (N = 4 - 7, n = 1), after (A) 3 hours, (B) 6 hours, and (C) 24 hours of haem incubation. All data are represented as mean ± SEM. Data was analysed using one-way ANOVA with Dunn's (B) or Bonferroni's (A-C) post-test. \*\* P 0.01, \*\*\*\* P ≤0.0001.

#### 4.2. Haem promotes moderate changes of markers of glycolysis

In recent years it has been shown that activated macrophages display an upregulated glycolysis, and it is now known that this metabolic shift is closely associated with an inflammatory phenotype in macrophages. Haem induces a pro-inflammatory macrophages activation, resulting in cytokine processing. In light of this, we investigated whether haem could favour glycolysis or oxidative phosphorylation (OXPHOS) of human macrophages.

To test this, PBMC-derived macrophages were stimulated with haem  $(5 - 50 \mu M)$  for 3, 6 and 24 hours. The expression glucose receptor (GLUT1) and the rate limiting glycolic enzyme (HK-2) were assessed by immunoblotting. In response to haem, GLUT1 and HK-2 expressions at the protein level were modulated. The densiometric analyses revealed that cultures stimulated

with 25  $\mu$ M haem for 3 h and 6 hours displayed a trend towards increase of GLUT1 and HK2, when compared to untreated (UT) cells. While haem stimulation for 24 hours showed a trend towards reduced expression of GLUT1, in association with an increased HK2 expression in macrophages stimulated with 25  $\mu$ M haem, both in comparison to UT cells (Figure 2).



Figure 2. Effects of Haem on expression of GLUT1 and HK-2 in human macrophages. Primary human macrophages were stimulated with haem at 5 - 50  $\mu$ M for 3 h, 6 h or 24 hours before supernatant harvest and cell lysing. Glut1 (A-C) and Hexokinase-2 (E-G) expression were assessed by immunoblotting from 7 independent cultures. Polled data is represented as mean  $\pm$ 

SEM relative to unstimulated (UT) control and normalised to vinculin housekeeping protein. (D) Representative western blots depicting expression of Glut1 and HK2 in whole cell lysates, in response to haem post 3 h, 6 h or 24 hours stimulation and LPS (100 ng/mL for 24 hours, as a positive control). Graph bars are representative of mean  $\pm$  SEM (N= 5–10; n= 6). Data was analysed using ANOVA with Bonferroni post-test or Kruskal Wallis with Dunn's post-test.

Next, the mRNA levels of the glycolytic markers *GLUT1*, *HK2*, *PFKFB3*, *GAPDH*, *PKM2* and hypoxia-induced factor (*HIF-1a*) were measured by real-time PCR analysis. Although there was no significant change observed in the mRNA levels of any of the glycolytic markers, compared to unexposed cells, the results showed that macrophages stimulated with 25 µM haem for 6 hours presented a trend towards increased GLUT1 and GAPDH expressions (Figure 3B and D). While a tendency towards augmented HK2 and PKM2 mRNA expression were observed upon prolonged (24 hours) haem exposure (Figure 3C and E).



Figure 3. Effects of Haem on glycolytic genes in primary human macrophages Primary human macrophages (1 x 10<sup>6</sup> cells/ml) were treated with haem (25  $\mu$ M or 50  $\mu$ M) for 3, 6 and 24 hours. (A) heat map showing the mRNA expression of GLUT1, HK2 (hexokinase2), PFKFB3, GAPDH, PKM2, and HIF1 $\alpha$ . (B-E) mRNA expression of GLUT1, HK2, GAPDH, and PKM2 in cultures stimulated with 25  $\mu$ M for 6 h or 24 hours. Genes expression was analysed by real-time PCR (N= 2-4, n = 1). All data is represented as mean ± SEM and analysed using One Way ANOVA with Dunnett's post-test. P>0.05.

Hypoxia-inducible factor (HIF-1) has been shown to transcriptionally regulate the expression of GLUT1 and HK2, allowing a higher capacity for increased glycolysis [52, 53]. Furthermore, HIF-1 coordinates the transcription of haem oxygenase-1 (HO-1), a potent antioxidant and antiinflammatory enzyme that catalyses the breakdown of haem [18, 54, 55]. Given the close relationship between haem catabolism and the inducibility of glycolytic genes involving the HIF-1, we looked at whether haem could drive the expression of the transcriptional factor HIF-1a. Haem (50  $\mu$ M) was found to induce a slight upregulation of HIF1-a mRNA at 24 hours stimulation, in comparison to UT macrophages. No effects of 25  $\mu$ M haem on mRNA of HIF1a wereobserved at the two time-points, but 50  $\mu$ M of haem at 24 hours seemed to upregulate HIF1-a mRNA (Figure 3A). However, these data are representative of one running assay with limited samples, therefore, to validate these results additional experiments will be needed.

# 4.3. The bioenergetic profile of primary human macrophages is not altered by haem

In order to determine if haem has an effect on metabolic reprogramming in macrophages, glycolysis was measured by the extracellular acidification rate (ECAR), and oxidative phosphorylation was quantified by the oxygen consumption rate (OCR), using the Seahorse XF96 Bioanalyzer.

Given that the glycolytic markers expression in response to haem was shown to be, probably, related to dose and time incubation, the primary human macrophages were stimulated, or not, with haem (25  $\mu$ M) for 6 h or 24 hours, while 50  $\mu$ M haem was used for 3 hours. Although no significant change was observed, there was a trend towards an increase in basal and glycolytic capacity (Figure 4B and C), with the greatest increase was seen after 24 hours with haem (25  $\mu$ M), relative to UT cells. There was also a trend towards an increase in the max respiration in haem stimulation at all time-points tested (Figure 5C), while there was a
trend towards a reduction to below baseline levels in respiration rate for 50  $\mu$ M haem (3 hours) and 25  $\mu$ M haem for 6 hours, when compared to UT cells (Figure 5B). At all time-points tested, there was no significant increase in the ECAR:OCR ratio in haem-stimulated macrophages, when compared to UT cells (Figure 6).



Figure 4. Effects of haem on rates of glycolysis in primary human macrophages. Primary human macrophages (1 x 10<sup>6</sup> cells/mL) were stimulated with 50  $\mu$ M haem for 3 hours, or 25  $\mu$ M for an extended time course of 6 h and 24 hours. (A) Bioenergetic profiles from one representative experiment depicting extracellular acidification (ECAR) measurements over time, before and after injections of oligomycin (1mM), FCCP (1mM), antimycin A (500 nM)/Rotenone (500

nM), and 2-DG (25 mM) post stimulation with haem. (B-C) Bar graphs demonstrating basal glycolysis, and max glycolysis. All data are represented as mean  $\pm$  SEM (N = 4, n =2) Data were analysed using RM One Way ANOVA with Dunnett's Test. P>0.05



Figure 5. Effects of haem on respiration rates in primary human macrophages. Primary human macrophages (1 x 10<sup>6</sup> cells/mL) were stimulated with 50  $\mu$ M haem for 3 hours, or 25  $\mu$ M for an extended time course of 6 h and 24 hours. (A) Bioenergetic profiles from one representative experiment depicting oxygen consumption (OCR) measurements over time, before and after the injections of oligomycin (1 mM), FCCP (1 mM), antimycin A (500 nM), and rotenone (500 nM), and 2-DG (25 mM), post stimulation with haem. (B-C) Bar graphs demonstrating basal

respiration and max respiration. Data are represented as mean  $\pm$  SEM (N = 4, n =2). Data were analysed using repeated measure One Way ANOVA with Dunnett's Test. P>0.05.



Figure 6. Relationship between glycolytic profile and oxidative phosphorylation in primary human macrophages after haem incubation. Primary human macrophages (1 x 10<sup>6</sup> cells/ml) were stimulated with 50  $\mu$ M haem for 3 hours, or 25  $\mu$ M for an extended time course of 6 h and 24 hours. Bar graph demonstrating basal glycolysis (ECAR): basal respiration (OCR) ratio after haem stimulation. All data are represented as mean  $\pm$  SEM (N = 4, n =2). Data were analysed using repeated measures One Way ANOVA with Dunnett's Test. P>0.05.

# 4.4. Haem enhances mitochondrial fission factor and mitochondrial ROS in primary human macrophages

Mitochondria are highly dynamic cytoplasmatic organelles that fulfil energy demands via the oxidative phosphorylation system, besides having an active role in calcium and DAMP signalling, metabolism, and apoptosis [56-59]. Nevertheless, metabolic reprograming of LPS-stimulated macrophages has been shown to drive mitochondrial fission, which is characterized by individual spherical mitochondria, and a shift to a glycolytic profile [60]. To assess the mitochondrial morphology upon haem stimulation, macrophages were incubated with cell-permeant Mitotracker<sup>TM</sup> to stain active mitochondria, and Hoechst for nuclear staining.

Confocal images showed that macrophages stimulated with haem at 50  $\mu$ M for 3 hours or at 25  $\mu$ M for 24 hours displayed network-like structures, such as those observed in untreated macrophages (Figure 7A). While images depicted a loss of mitochondrial elongation and a shift to a spherical-like morphology at 6 hours post 25  $\mu$ M haem stimulation; there was no changes in eccentricity and aspect ratio of the mitochondria, when related to UT macrophages (Figure 7B and C).



Figure 7. Mitochondrial fission and fusion upon haem stimulation. Primary human macrophages (1 x 10<sup>6</sup> cells/ml) were stimulated with 50  $\mu$ M haem for 3 hours, or 25  $\mu$ M for an extended time course of 6 h and 24 hours. Cells were stained with Mitotracker (red) to assess mitochondrial morphology, and counterstained with Hoechst (blue) to show nuclei. Cells were imaged using a Leica SP8 scanning confocal microscope. (A) Representative images of untreated and haem stimulated macrophages at 3 h, 6 h and 24 hours. (B-C) Shape parameters of mitochondria were quantified using Cell Profiler software (N = 2, n = 2). Data were analysed using one-way ANOVA with Dunnett's test. P>0.05.

The opposing processes of fusion and fission, which are essential for maintaining mitochondrial heath and function, are regulated by several proteins and receptors located on both outer and inner membranes [61]. Mitochondrial fission factor (MFF) is an outer membrane protein, which acts as a receptor that recruits Drp1, resident in the cytosol, to the mitochondrial surface, forming tubules to mediate fission [62, 63]. Because cells lacking MFF have more elongated mitochondria [60, 64, 65], these changes were further assessed by immunoblotting in macrophages stimulated with haem for 3 h, 6 h, and 24 hours. A significant increase in the expression of MFF protein was observed at 6 hours post 25  $\mu$ M haem stimulation, when compared to unstimulated cells, whereas a trend towards an increase was observed at 3 hours of 50  $\mu$ M haem, and a tendency towards a reduction was seen after 24 hours of haem (25  $\mu$ M) incubation (Figure 8).



Figure 8. Haem promotes enhancement of mitochondrial fission factor expression in primary human macrophages. (A) Densitometric analysis of western blots (N = 3-8) using Biorad software. Bar graphs illustrate the mean  $\pm$  SEM increase in protein expression relative to unstimulated cells and normalised to  $\beta$ - actin housekeeping protein. (B-C) Representative western blots demonstrating expression of MFF in response to haem. All data were analysed using One Way ANOVA with Dunnett's post-test. \*P≤0.05.

Given the significant changes in mitochondrial fission factor in haem-stimulated macrophages, we next investigated whether haem could induce mitochondrial stress or dysfunction, as indicated by the production of mitochondrial ROS (mROS). For this, following haem stimulation, primary human macrophages were incubated with MitoSOX<sup>TM</sup> Red, a cell

permeant reagent that targets the mitochondria. Upon mitochondrial superoxide release the reagent is oxidised producing a bright fluorescence that can be detect using flow cytometry. In response to haem treatment (50  $\mu$ M for 3 hours), a significant increase in median fluorescence intensity (MFI) of MitoSox stained cells was observed relative to UT cell, indicating robust production of mROS. There was also a trend toward increased mROS generation after 25  $\mu$ M haem for 6 hours (Figure 9), while no change was observed in mROS generation in macrophages stimulated with haem for 24 hours.



Figure 9. Haem drives mitochondrial ROS production in primary human macrophages. Primary human macrophages (5 x 10<sup>5</sup> cells/ml) were stimulated with 50  $\mu$ M haem for 3 hours or 25  $\mu$ M for an extended time course of 3 h, 6 h and 24 hours. Cells were stained with MitoSox<sup>TM</sup> Red to assess mitochondrial ROS production and analysed by flow cytometry. (A) Bar graph illustrates the mean ± SEM increase in MFI relative to untreated control (N= 6, n= 3). (B) Representative histogram demonstrating median fluorescence intensity (MFI) of MitoSox<sup>TM</sup> in unstimulated (UT) and haem stimulated cells. Data was analysed using One Way ANOVA with Dunnett's post-test. \*P≤0.05.

## 4.5. S100A8 Alarmin moderately modulates glycolytic markers expression on primary human macrophages

A previous study showed that haem-stimulated macrophages release the alarmin S100A8, which in turn, induces a shift in pro-inflammatory macrophages to further produce pro-IL-1 $\beta$  [66]. The metabolic reprograming induced by proteins of S100 family is described in different set of cells, including osteoblasts, and gastric and breast cancer cells [67-70], however information is lacking about how S100 proteins change the metabolism in macrophages. To test this, primary human macrophages were treated with recombinant human S100A8 for 3 h, 6 h and 24 hours and the protein expressions of GLUT1 and HK2 were analysed by western blotting. Following a short incubation with S100A8, GLUT1 and HK2 protein levels trended towards a reduction when compared to UT cells. An augmentation of these proteins was observed post 24 hours of S100A8 stimulation, although this change was not significant when compared to unstimulated cells (Figure 11A and B).



Figure 10. Effects of S100A8 on expression of glycolytic markers in primary human macrophages. (A-B) Primary human macrophages (5 x  $10^5$  cells/mL) were stimulated with recombinant human S100A8 (1 µg/mL) for 3 h, 6 h or 24 hours for assessing GLUT1 and Hexokinase-2 in whole cell lysate by western blot (N= 4, n= 2). All data is represented as mean  $\pm$  SEM and analysed using One Way ANOVA with Dunnett's post-test. P>0.05.

To further investigate the effects of S100A8 on the expression of glycolytic markers, next, primary human macrophages were stimulated with S100A8 for 24 hours, and the expression of GLUT1, HK2, PFKFB3, GAPDH, and PKM2 at mRNA levels were measured by real-time PCR. The preliminary results showed a trend towards reductions in GLUT1, HK2, GAPDH, and PKM2 mRNA expression in S100A8-stimulated macrophages, at levels below those of unstimulated cells (Figure 11Figure 11A and B-C). In comparison to UT macrophages, a nonsignificant minor increase in PFKFB3 mRNA expression was found post S100A8 stimulation (Figure 11A and D).

The control of these glycolytic genes is also trigged by mTORC1 through the HIF1-a activity, driving an enhanced glycolytic response [52, 71]. As such, the impact of S100A8 stimulation on HIF1-a gene expression on macrophages was then assessed by real-time PCR. Following 24 hours of exposure to S100A8, a trend towards an increase in HIF1-a mRNA was detected, when compared to macrophages without S100A8 stimulation (Figure 11A and E). However, due to the limited number of samples analysed, these preliminary data need to be confirmed with a greater experimental number.



Figure 11. Effects of S100A8 on the expression of glycolytic markers in primary human macrophages. (A-B) Primary human macrophages (5 x  $10^5$  cells/mL) were stimulated with recombinant human S100A8 (1 µg/mL) for 24 hours to assess mRNA expression. (A) Heat map showing the mean mRNA expressions of *GLUT1*, *HK2 (hexokinase2)*, *PFKFB3*, *GAPDH*, *PKM2*, and *HIF1a* post S100A8 stimulation for 24 hours. (B-E) Graphic representation of mRNA expression of *GLUT1*, *HK2*, *GAPDH*, *and PKM2* on macrophages stimulated with S100A8 for 24 hours. Gene expressions were analysed by real-time PCR (N= 2-4, n = 1). All data are represented as mean  $\pm$  SEM and analysed using One Way ANOVA with Dunnett's post-test. P>0.05.

# 4.6. Effects of S100A8 alarmin on the bioenergetic profile of primary human macrophages

In order to determine if S100A8 has an effect on metabolic reprograming, macrophages were stimulated with S100A8 (1  $\mu$ g/mL) for 6 hours or 24 hours. The metabolic activity, measured by ECAR (glycolysis) and OCR (oxidative phosphorylation), was analysed in the Seahorse XFe96 analyser. Macrophages stimulated with S100A8 for 6 hours showed a slight increase in the basal (Figure 12B; turquoise bar) and max (Figure 12C; turquoise bar) glycolysis, and a trend towards a reduction in basal respiration (Figure 13B; turquoise bar), while max respiration increased (Figure 13C; turquoise bar), when compared to UT cells.

When S100A8 was incubated for a prolonged time (24 hours), it was observed that macrophages tended to reduce glycolysis rates (Figure 12B-C; purple bar) and respiratory rates Figure 13C; purple bar), although the ECAR:OCR ratio indicates a tendency of these macrophages to favour glycolytic metabolism over OXPHOS (Figure 14; purple bar)



Figure 12. Effects of S100A8 on rates of glycolysis in primary human macrophages. Primary human macrophages (1 x 10<sup>6</sup> cells/mL) were stimulated with recombinant human S100A8 (1 µg/mL) 6 hours or 24 hours. (A) Bioenergetic profiles from one representative experiment depicting extracellular acidification (ECAR) measurements over time, before and after injections of oligomycin (1mM), FCCP (1mM), antimycin A (500 nM)/Rotenone (500 nM), and 2-DG (25 mM) post stimulation with haem. (B-C) Bar graphs demonstrating basal glycolysis, and max glycolysis. All data are represented as mean  $\pm$  SEM (N = 4, n = 2) Data were analysed using RM One Way ANOVA with Dunnett's Test. P>0.05.

Α



Figure 13. Effects of S100A8 on respiration rates in primary human macrophages. Primary human macrophages (1 x 10<sup>6</sup> cells/mL) were stimulated with recombinant S100A8 (1  $\mu$ g/mL) for 6 hours or 24 hours. (A) Bioenergetic profiles from one representative experiment depicting oxygen consumption (OCR) measurements over time, before and after the injections of oligomycin (1 mM), FCCP (1 mM), antimycin A (500 nM), and rotenone (500 nM), and 2-DG (25 mM), post stimulation with haem. (B-C) Bar graphs demonstrating basal respiration and max respiration. Data are represented as mean ± SEM (N = 4, n =2). Data were analysed using repeated measure One Way ANOVA with Dunnett's Test. P>0.05.



Figure 14. Relationship between glycolytic profile and oxidative phosphorylation in primary human macrophages after S100A8 incubation. Primary human macrophages (1 x 10<sup>6</sup> cells/ml) were stimulated with recombinant human S100A8 (1  $\mu$ g/mL) for 6 hours or 24 hours. Bar graph demonstrating ratio of basal glycolysis (ECAR): basal respiration (OCR) after haem stimulation. All data are represented as mean ± SEM (N = 4, n =2). Data were analysed using repeated measure One Way ANOVA with Dunnett's Test. P>0.05.

# 4.7. S100A8 induces mitochondrial ROS, but has no effect on the mitochondrial shape of primary human macrophages

Next, we investigated whether S100A8 alarmin could induce mitochondrial stress dysfunction, as indicated by production of mROS. Primary human macrophages were stimulated with S100A8 for 6 hours or 24 hours, prior to incubation with MitoSox. In response to S100A8 stimulation, a significant increase in MFI of MitoSox stained cells was observed relative to untreated cells at 6 hours. A non-significant decrease in the MFI was observed at 24 hours in comparison to 6 hours stimulation, trending towards the basal MFI displayed by untreated macrophages (Figure 15).



Figure 15. S100A8 drives mitochondrial ROS production in primary human macrophages. Primary human macrophages (5 x  $10^5$  cells/ml) were stimulated with recombinant human S100A8 (1 µg/mL) for 3 hours or 6 hours. Cells were stained with MitoSox<sup>TM</sup> Red to assess mitochondrial ROS production and analysed by flow cytometry. (A) Bar graph illustrates the mean ± SEM increase in MFI relative to untreated control (N= 3, n= 1). (B) Representative histogram demonstrating median fluorescence intensity (MFI) of MitoSox<sup>TM</sup> in unstimulated and haem stimulated cells. Data was analysed using repeated measures One Way ANOVA with Sidak's post-test. \*P≤0.05.

Given the significant mitochondrial ROS generation in S100A8-stimulated macrophages, we then invested whether S100A8 alarmin could induce changes in mitochondrial shape, which was assessed through Mitotracker<sup>™</sup> staining and confocal imaging of cells stimulated with S100A8 for 3 hours or 6 hours. As indicated by staining (Figure 16A), the mitochondrial morphology of S100A8 stimulated and UT cells mostly presented as elongated structures, highly interconnected networks, with rare small and round mitochondria, characterizing morphological heterogeneity, suggestive of continuous fission and fusion dynamic. In fact, there was no difference in the mitochondria observed after S100A8 stimulation, as represented by unchanged eccentricity (Figure 16B) and aspect ratio (Figure 16C).



Figure 16. Mitochondrial fission and fusion upon S100A8 stimulation. Primary human macrophages (1 x 10<sup>6</sup> cells/ml) were stimulated with recombinant human S100A8 (1  $\mu$ g/mL) for 3 hours or 6 hours. Cells were stained with Mitotracker<sup>TM</sup> (red) to assess mitochondrial morphology, and counterstained with Hoechst (blue) to show nuclei. Cells were imaged using a Leica SP8 scanning confocal microscope. (A) Representative images of unstimulated (UT) and haem stimulated macrophages at 3 hours or 6 hours. (B-C) Shape parameters of mitochondria were quantified using Cell Profiler software (N = 2, n = 1). Data were analysed using one-way ANOVA with Dunnett's test. P>0.05.

#### 4.8. S100A8 priming potentializes mitochondrial ROS generation induced by haem

Given the significant changes in mitochondrial dynamics in haem-stimulated macrophages, it was next investigated whether S100A8 priming could enhance haem-driven mitochondrial stress or dysfunction, as indicated by production of mitochondrial ROS. Primary human macrophages were incubated with S100A8 (1  $\mu$ g/mL) for 24 hours, followed by haem

for an additional 6 hours (25  $\mu$ M) or 3 hours (50  $\mu$ M), prior to incubation with MitoSOX<sup>TM</sup>Red. In response to haem alone, a tendency to increase in median fluorescence intensity (MFI) of MitoSOX<sup>TM</sup> stained cells was observed relative to basal conditions, at both 3 and 6 hours. A similar increase in MitoSOX<sup>TM</sup> stained cells was found with the S100A8 stimulus at 24 hours. Interestingly, priming macrophages with S100A8 for 24 hours prior to haem stimulation significantly increased the MFI of MitoSOX<sup>TM</sup> stained cells for both haem incubation times and concentrations, when compared to UT cells (Figure 17A-B).



Figure 17. Effects of S100A8 priming and haem stimulation on mitochondrial ROS production in primary human macrophages. Primary human macrophages (5 x 10<sup>5</sup> cells/ml) were stimulated with recombinant human S100A8 (1  $\mu$ g/mL) for 24 hours alone or followed by haem (50  $\mu$ M for 3 hours or 25  $\mu$ M for 6 h). Cells were stained with MitoSox<sup>TM</sup> Red to assess mitochondrial ROS production and analysed by flow cytometry. (A and B) Bar graphs illustrate the mean ± SEM increase in MFI relative to untreated control (N= 3 - 7, n= 2). (C and D) Representative histogram demonstrating median fluorescence intensity (MFI) of MitoSox<sup>TM</sup> in

unstimulated and S100A8/haem stimulated cells. Data were analysed using repeated measures One Way ANOVA with Sidak's post-test.  $*P \le 0.05$ .

# 4.9. Effects of S100A8 priming and haem stimulation on glycolytic markers in primary human macrophages

In order to determine whether the pre-stimulation of cells with S100A8 alarmin has an effect on the protein expressions of GLUT-1 and HK-2 in haem-stimulated macrophages, cells were primed with S100A8 (1  $\mu$ g/mL) for 3 h or 24 hours alone, and with posterior haem (50  $\mu$ M) for an additional 3 hours; or combined with haem (50  $\mu$ M) for 6 hours.

Both the combination of S100A8 priming and haem stimulus (3 h post treatment), and the simultaneous combination of S100A8 and haem significantly decreased the expression of the glucose receptor GLUT1, when compared to UT cells, and a trend towards a reduction was found in contrast to haem only (Figure 18A-B). While S100A8 priming (3 h) significantly reduced HK-2 expression in relation to UT, the addition of haem likely reversed this effect, leading to a slight increase in HK-2 expression in macrophages (Figure 18D). Conversely, the combination of S100A8 and haem (6 h) appeared to reduce the expression of HK-2, when compared to haem alone, leading to values that were close to those of UT cells (Figure 18E).

Meanwhile, when a prolonged time of S100A8 priming (24 h) was applied to the cells, and then haem was added for another 3 h, the protein expression of GLUT1 trended towards an increase in comparison to UT and haem alone (Figure 18C). Consistent with this finding, the priming of macrophages with S100A8 for 24 hours significantly increased the expression of HK-2 in response to haem (Figure 18F). Together, these results suggest a temporal effect of S100A8 priming to induce changes in the metabolism of haem-stimulated macrophages.



Figure 18. Effects of S100A8 priming and Haem stimulation on the expression of glycolytic markers in primary human macrophages. Primary human macrophages (5 x  $10^5$  cells/mL) were stimulated with recombinant human S100A8 (1 µg/mL) for 3 h, 6 h or 24 hours alone or followed by haem for another 3 h (A and C; D and F) or co-incubated for 6 hours with 50 µM haem (B, E) and then assessed for GLUT1 and Hexokinase-2 expressions in whole cell lysates by western blot (N= 4, n= 2). All data are represented as mean ± SEM and analysed using One Way ANOVA with Dunnett's post-test. \*P>0.05; each image above a graph represents the western blots depicting expressions of Glut1 and HK2 in whole cell lysates.

# 4.10. Effects of S100A8 priming on the metabolic profile of haem-stimulated macrophages

Having observed changes in glycolytic markers on S100A8-primed macrophages following haem stimulation, we next investigated whether S100A8 priming could modulate the metabolic shift of primary human macrophages induced by haem incubation. To test this, cells were incubated with S100A8 (1  $\mu$ g/mL) for 24 hours prior to a haem stimulus (25  $\mu$ M) for an additional 6 hours and ECAR and OCR rates were assessed using the Seahorse XFe96 bioanalyzer. Preliminary results showed that S100A8-primed macrophages trended towards an increase in basal glycolysis (Figure 19B), without affecting glycolytic capacity (Figure 19C), compared to cells that were only stimulated with haem. Although all the stimuli were likely to induce a reduction in the basal respiration and augmentation in max respiration, when compared to UT cells, no changes were observed between S100A8-stimulated macrophages and cells challenged with haem (Figure 19E-F). Accordingly, the overall ECAR:OCR rate demonstrated that S100A8 priming is likely to further favour glycolysis over OXPHOS in macrophages, when in the presence of haem (Figure 21A).



Figure 19. Effects of S100A8 priming and haem stimulation on rates of glycolysis in primary human macrophages. Primary human macrophages (1 x  $10^6$  cells/mL) were stimulated with

recombinant human S100A8 (1  $\mu$ g/mL) for 24 hours alone or followed by haem (25  $\mu$ M) for 6 hours. (A and D) Bioenergetic profiles from one representative experiment depicting extracellular acidification (ECAR; A-C) and oxygen consumption (OCR; D-F) measurements over time, before and after injections of oligomycin (1mM), FCCP (1mM), antimycin A (500 nM)/Rotenone (500 nM), and 2-DG (25 mM) post stimulation. Bar graphs demonstrating basal glycolysis(B), max glycolysis (C), basal respiration (E), and max respiration (F). All data are represented as mean  $\pm$  SEM (N = 4, n =2) Data were analysed using RM One Way ANOVA with Dunnett's Test. P>0.05.

Since we noted that haem may exert metabolic functions that are dependent on time and concentration, we also looked at the bioenergetic profile of S100A8-primed macrophages (24 h) that were stimulated with 50  $\mu$ M haem for another 3 hours. Rates of ECAR and OCR were measured using the Seahorse XFe96 Bioanalyzer. Similarly to previous observations, S100A8 stimulation resulted in priming of the cells, and probably increases basal glycolysis (Figure 20B) and max glycolysis (Figure 20E) in the presence of 50  $\mu$ M haem. Additionally, S100A8-primed macrophages tended to exhibit a slight increase in both basal (Figure 20E) and max (Figure 20F) respiration following incubation with high doses of haem. This may suggest that cells are undergoing to an equilibrated bioenergetic profile, as the ECAR:OCR ratio showed that in haem stimulation favoured neither glycolysis nor OXPHOS, as these values were close to those found in UT cells (Figure 21).



Figure 20. Effects of S100A8 priming and haem stimulation on rates of glycolysis in primary human macrophages. Primary human macrophages (1 x 10<sup>6</sup> cells/mL) were stimulated with recombinant human S100A8 (1  $\mu$ g/mL) for 24 hours alone or followed by haem (50  $\mu$ M) for 3 hours. (A and D) Bioenergetic profiles from one representative experiment depicting extracellular acidification (ECAR; A-C) and oxygen consumption (OCR; D-F) measurements over time, before and after injections of oligomycin (1mM), FCCP (1mM), antimycin A (500 nM)/Rotenone (500 nM), and 2-DG (25 mM) post stimulation. Bar graphs demonstrating basal glycolysis(B), max glycolysis (C), basal respiration (E), and max respiration (F). All data are represented as mean  $\pm$  SEM (N = 4, n =2) Data were analysed using RM One Way ANOVA with Dunnett's Test. P>0.05.



Figure 21. Relationship between glycolytic profile and oxidative phosphorylation in primary human macrophages after S100A8 incubation. Primary human macrophages (1 x 10<sup>6</sup> cells/ml) were stimulated with recombinant human S100A8 (1  $\mu$ g/mL) for 24 hours and stimulated with haem for another 6 hours (25  $\mu$ M; A) or 3 hours (50  $\mu$ M; B). Bar graph demonstrating ratio of basal glycolysis (ECAR): basal respiration (OCR) after each stimulus, as indicated. All data are represented as mean  $\pm$  SEM (N = 4, n =2). Data were analysed using repeated measure One Way ANOVA with Dunnett's Test. P>0.05.

#### 5. Discussion

The pro-inflammatory activity of cell-free haem and haemoglobin has been extensively studied and represents a well-established factor that mediates tissue damage in diseases and disorders in which intravascular haemolysis occurs, such as sickle cell anaemia and malaria. As a DAMP, cell-free haem activates the innate immune system through activation of TLR4 trigging nuclear factor kappa B (NF- $\kappa$ B) translocation to the nucleus, and subsequently, the expression of proinflammatory cytokines as such TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  [20, 25, 31, 72]. We observed that primary human macrophages treated in vitro with haem secreted large amounts of TNF- $\alpha$  in dose and time-depend manner. This aligns with existing knowledge of haem as an inducer of pro-inflammatory macrophage activation.

As a major proinflammatory cytokine involved in early/acute inflammatory events, TNFa also triggers a cascade of several other inflammatory molecules resulting in reactive oxygen species (ROS) production [73, 74]. The cellular pathways involved in TNF-dependent ROS generation are reported to occur via TNF receptor1 (TNFR1) activation, enabling NAD (NADPH) oxidase (NOX) 1 or NOX2 complex activation, which leads to hydrogen peroxide production, a major intracellular ROS source [75]. Studies outlined the multiple sources and mechanism for ROS induced by haem, which include NOX activity and mitochondrial stress [20]. Here, we found that haem drives an early and robust mROS generation in macrophages, whereas for a prolonged exposure at a moderate concentration (25  $\mu$ M), haem promoted lowlevel mROS generation in primary human macrophages. It is noteworthy that this mitochondrial ROS generation also promotes interactions between activated caspase 8, Reactive Oxygen Species Modulator 1 (ROMO1), and transmembrane molecule Bcl-XL, leading to reduced mitochondrial membrane potential [76], it is likely that the mROS induced by haem may occur due to perturbation in bioenergetic profile of the mitochondria.

This is not the first study to report mROS generation in haem-stimulated cells. Indeed, haem is described to activate spleen tyrosine kinase (Syk) and induce early mROS generation in murine macrophages [77]. Importantly, mitochondria are highly dynamic and responsive to cellular stress, participating in cell clearance metabolism. For example, as a result of enhanced intracellular ROS, activated AMP protein kinase (AMPK) phosphorylates mitochondrial fission factor (MFF) [78]. It is well established that mitochondrial fission and fusion contribute to mitochondrial biogenesis, while dysregulation of mitochondrial dynamic is linked to

upregulated glycolysis or exacerbated oxidative phosphorylation [79-81]. Intriguingly, here we found that, in response to haem stimulation, human macrophages exhibited enhancement of MFF protein expression. Although there was no difference in the mitochondrial aspect ratio after haem incubation, we observed that several macrophages exhibited small rounded mitochondria, which is suggestive of mitochondrial fragmentation (fission). Indeed, a recent study showed that haem was able to impair mitochondria mass and its dynamics in murine bone marrow-derived macrophages [82]. Additionally, the fundamental mitochondrial process of OXPHOS, linked to tricarboxylic acid cycle (TCA), and to the production of ATP through the electron transport chain (ETC), results in mROS [83, 84]. Therefore, it is plausible that haem and its inflammatory pathways might impact cellular metabolism, as indicated by mitochondrial dysfunction.

In recent years, a number of studies have highlighted the involvement of cytokines in the modulation of glycolysis-regulating enzymes, and of cellular metabolism [42-44, 85]. As haem induces an inflammatory response, including cytokine IL-1ß processing, which activates HK-2, the first and limiting glycolytic enzyme, and since glycolysis is a key metabolic pathway associated with inflammation [86, 87], we may expect haem to drive glycolytic marker expression and macrophage metabolism towards glycolysis. Initial experiments showed that haem stimulation appears to increase the expressions of the glucose transporter 1, GLUT1, and the glycolysis limiting enzyme, HK-2, particularly at specific time points and concentrations. In addition, measurements of ECAR and OCR rate indicated that haem stimulation almost drove a metabolic shift towards glycolysis. Intriguingly, longer exposures to haem nearly favoured oxidative metabolism, suggesting that upon haem stimulus, macrophages can shift their bioenergetic profile to match functionality in a time and dose-dependent manner. Macrophage activation is followed by rapid changes in nutrient flux to meet their immune and function requirements. For instance, polarized pro-inflammatory macrophages induced by INF- $\gamma$  and LPS display a metabolic shift towards the glycolytic pathway, whereas anti-inflammatory macrophages, induced by IL-4, remain almost unaffected in the pathway [88-90]. Notably, as a mechanism to attenuate the extensive oxidative damage of haem, macrophages tightly regulate haem catabolism, preventing its cytotoxic effects. Such mechanisms occur via the establishment of positive signalling feedback loops involving IL-10 and upregulation of haem oxygenase-1 (HO-1), promoting polarization of macrophages towards a "tissue healing" function [91]. These results support previous findings in murine BMDM, where haem drives a unique metabolic reprogramming from OXPHOS towards glucose consumption, which was shown to be controlled by HO-1 and carbon monoxide (CO) generation [92].

As a key enzyme in the oxidative degradation of haem, HO-1 has antioxidant and antiinflammatory properties, producing free ferrous iron, and CO [93]. Exposure of macrophages to CO results in a significant and transient burst of mROS, promoting rapid activation and stabilization of HIF-1a, a transcription factor known to regulate the gene expression of IL-1 $\beta$ and promote glycolytic metabolism [94]. In this study, we demonstrated that the expression of HIF-1a was slightly upregulated following haem stimulation, particularly at higher concentrations and with longer incubation times, whereas a trend towards downregulation was observed at lower concentrations. It is important to note that iron is required for constitutive HIF degradation, enhancement of the NF-kB pathway, and TNF-a expression [95]. Therefore, these could likely explain why haem at first seemed to downregulate the gene expression of HIF-1a. Furthermore, it has been shown that, in haem-loaded murine macrophages, metabolic reprogramming is independent of the activity of HIF-1a [92]. However, further work is required to confirm this.

It is now well established that metabolic reprogramming of immune cells is linked to an inflammatory phenotype in non-infectious diseases, including cancer rheumatoid arthritis (RA), diabetes, systemic lupus erythematosus, and sickle cell anaemia (SCA) [82, 92, 96]. While LPS and IFN $\gamma$  are routinely used *in vitro* as inducers of metabolic reprogramming, there are few studies examining the role of DAMPs or alarmins in mediating these effects. It was of importance in this study, not only to determine whether haem drives metabolic reprogramming, but additionally the potential of the S100A8 alarmin to rewrite the bioenergetics of macrophages.

Produced largely by neutrophils and macrophages, S100A8 forms a heterodimer with the S100A9, and this S100A8/S100A9 complex functions as a pro-inflammatory DAMP [35, 97, 98]. S100A8 is however the functional unit of the heterodimer that is able to engage TLR4<sup>-</sup> in turn activating NF-κB [99]. Of note, we have previously shown increased S100A8 systemic levels in a haemolysis-induced mouse model, and that haem induces S100A8 release from human macrophages [66]. Herein, our findings suggest that S100A8 alarmin has the potential to modulate the metabolism of macrophages.

At first, we found that brief exposure of macrophages to S100A8 resulted in a decrease in the expressions of GLUT1 and HK-2 at the protein levels, similarly to the impairment of cellular

energy metabolism previously reported in cord blood macrophages, where S100A8 supressed mTOR complex activity and prevented glycolysis [100]. mTOR is a member of the PI3Krelated kinase protein family, and functions through two complexes, mTOR complex 1 (mTORC1) and mTOR complex 2 (mTORC2). Each complex has specific functions in cell signalling and metabolism [101]. mTORC1 is known to promote increased glycolysis in classically-activated macrophages, by inducing GLUT1 and HK-2 expression [102, 103]. mTORC2, in contrast, is essential for anti-inflammatory macrophage metabolic reprogramming [104, 105]. While further work is needed to establish the possible correlation between the earlier effects of S100A8 on the PI3K/Akt/mTOR pathway, the potential inhibition of mTOR might be the mechanism linked to a rapid response to S100A8, leading to the reduced expressions of glycolytic markers such as, of GLUT1 and HK-2. Additionally, as an early effect of S100A8, we also observed increased mROS generation in primary human macrophages. Although mTOR complex activation also promotes the production of nitric oxide, feeding the electron transport chain, thus mediating mitochondrial biogenesis, it is likely that the S100A8-induced mROS observed in our results occurs independently of mTOR and might be linked to a process trigged by TLR4 and RANGE activation, since activation of these by S100A8 has been shown to drive ROS generation [37, 106]. Further investigations involving specific inhibitors, such as TAK-242, RAP, and BAY 11-7982, could provide additional insight and confirmation.

The metabolism of immune cells can be reprogrammed, leading to changes in how they function. One example of this is the possibility for communication between different signalling pathways. This interaction could appear as direct opposing effects, such as the interplay between mTORC1 and AMPK, or between Akt and LKB1 [87, 107]. As a result, the cross-interaction between immunometabolism signalling networks is likely to facilitate metabolic adjustments, enabling cells to fulfil energy and biosynthesis requirements for functioning within specific microenvironments. Such metabolic adjustment is suggested in this study. Conversely to the result discussed above, our findings showed that prolonged S100A8 stimulation induced the protein expressions of the key glycolytic markers, GLUT1 and HK-2. In addition, preliminary results obtained from RT-PCR analysis indicated upregulation of the mRNA of PFKFB3 and HIF-1a, suggesting that upon longer exposure to S100A8, in contrast to short exposure, macrophages could undergo a bioenergetic shift. In fact, these results were followed by a trend towards glycolysis, as denoted by a trend towards an increased ECAR:OCR ratio, suggesting that longer exposure to the S100A8 alarmin may enhance the glycolytic metabolism of primary human macrophages. Furthermore, a related increase in mROS

54

generation was detected in S100A8-loaded cells, however, the OCR rate remained unchanged under these conditions. In fact, a recent study showed that S100A8 triggered a significant glycolytic activity of inflammatory monocyte-derived macrophage, without affecting OXPHOS [108].

Based on the above findings, the next aim of this study was to assess the metabolic reprogramming of primary human macrophages in response to prolonged S100A8 prestimulation (priming) following haem challenge. This is the first study to show the interplay of sterile stimuli with immunometabolic modulation. Our findings indicate intriguing impacts of S100A8 priming, which potentialize the effects of haem on the glycolytic markers, Glut-1 and HK-2. Extracellular S100A8 is known to bind to the receptors, TLR4 and RAGE, facilitating the phosphorylation of mitogen-activated protein kinase (MAPks) [109]. MAPk p38 activity results in the upregulation of glycolytic factors GLUT1, 4, and 2, and PFKFB3 fuels glucose uptake and increases the glycolysis pathway [110-113]. Furthermore, by measuring the bioenergetic profile of macrophages primed with S100A8 and followed by haem stimulation, we found that S100A8 induced higher basal glycolysis in haem-stimulated cells, without significantly amplifying the glycolytic capacity profile. This observation suggests that S100A8 may influence the basal energy requirements of macrophages, potentially altering their responsiveness to subsequent stimuli. Additionally, a trend towards increased maximal respiration, indicative of OXPHOS, was noted in S100A8-primed macrophages after haem loading, suggesting that, while S100A8 stimulation may induce higher basal glycolysis, it also amplified the respiratory capacity of the cells. It is noteworthy that, following haem stimulation, S100A8-primed macrophages displayed a significant increase in mROS generation, indicating oxidative stress, which may be linked to an elevated mitochondrial respiration capacity [114, 115]. Finally, these observations suggest a synergistic interaction between S100A8 and haem, which may have implications for the pro-inflammatory phenotype and metabolic profile of macrophages.

In summary, the findings of this study show that haem and S100A8, alone, each have the potential to alter the metabolism of primary human macrophages. In addition, important insight was gained on the mechanism in which DAMPS may coordinate the intrinsic pathways between sterile inflammation and metabolic reprograming. Given the intrinsic relationship between the pathways that regulate cell metabolism and the inflammatory response, further research is required to investigate these inflammatory mechanisms, in particular those related to cytokine generation and dysregulation of metabolism.

#### 6. References

1. Guillaud, C., V. Loustau, and M. Michel, *Hemolytic anemia in adults: main causes and diagnostic procedures.* Expert Rev Hematol, 2012. **5**(2): p. 229-41.

Dhaliwal, G., P.A. Cornett, and L.M. Tierney, Jr., *Hemolytic anemia*. Am Fam Physician, 2004.
 69(11): p. 2599-606.

3. Beck, N., *Anemia: General Considerations*, in *Diagnostic Hematology*. 2014, Springer: London. p. 199-218.

4. Conran, N., *Intravascular hemolysis: a disease mechanism not to be ignored*. Acta Haematol, 2014. **132**(1): p. 97-9.

 Costa, F.F.F., K. M. Conran, N., Síndrome hemolítica. Fisiopatologia e clínica - classificação, in Tratado de hematologia, M.A.F. Zago, R. P.; Pasquini, R. , Editor. 2013, Atheneu: São Paulo. p. 161-167.

6. Rother, R.P., et al., *The clinical sequelae of intravascular hemolysis and extracellular plasma hemoglobin: a novel mechanism of human disease.* JAMA, 2005. **293**(13): p. 1653-62.

Kato, G.J., et al., *Cerebrovascular disease associated with sickle cell pulmonary hypertension*.
 Am J Hematol, 2006. 81(7): p. 503-10.

8. Hill, A., S.J. Richards, and P. Hillmen, *Recent developments in the understanding and management of paroxysmal nocturnal haemoglobinuria*. Br J Haematol, 2007. **137**(3): p. 181-92.

9. Ataga, K.I., et al., *Pulmonary hypertension in patients with sickle cell disease: a longitudinal study.* Br J Haematol, 2006. **134**(1): p. 109-15.

10. Andrieu, V., O. Dumonceau, and M.J. Grange, *Priapism in a patient with unstable hemoglobin: hemoglobin Koln*. Am J Hematol, 2003. **74**(1): p. 73-4.

11. Taher, A., et al., *Pulmonary thromboembolism in beta-thalassemia intermedia: are we aware of this complication?* Hemoglobin, 2002. **26**(2): p. 107-12.

Conran, N. and J.D. Belcher, *Inflammation in sickle cell disease*. Clin Hemorheol Microcirc, 2018. 68(2-3): p. 263-299.

13. Kato, G.J., *Haptoglobin halts hemoglobin's havoc*. J Clin Invest, 2009. **119**(8): p. 2140-2.

Schaer, D.J., A.I. Alayash, and P.W. Buehler, *Gating the radical hemoglobin to macrophages: the anti-inflammatory role of CD163, a scavenger receptor.* Antioxid Redox Signal, 2007. 9(7): p. 991-9.

15. Kato, G.J. and J.G.t. Taylor, *Pleiotropic effects of intravascular haemolysis on vascular homeostasis*. Br J Haematol, 2010. **148**(5): p. 690-701.

Belcher, J.D., et al., *Heme degradation and vascular injury*. Antioxid Redox Signal, 2010.
 12(2): p. 233-48.

17. Quaye, I.K., *Extracellular hemoglobin: the case of a friend turned foe*. Front Physiol, 2015. 6:p. 96.

18. Schaer, D.J., et al., *Hemolysis and free hemoglobin revisited: exploring hemoglobin and hemin scavengers as a novel class of therapeutic proteins.* Blood, 2013. **121**(8): p. 1276-84.

 Roumenina, L.T., et al., *Heme: Modulator of Plasma Systems in Hemolytic Diseases*. Trends Mol Med, 2016. 22(3): p. 200-213.

20. Dutra, F.F. and M.T. Bozza, *Heme on innate immunity and inflammation*. Front Pharmacol, 2014. **5**: p. 115.

21. Schmitt, T.H., W.A. Frezzatti, Jr., and S. Schreier, *Hemin-induced lipid membrane disorder and increased permeability: a molecular model for the mechanism of cell lysis.* Arch Biochem Biophys, 1993. **307**(1): p. 96-103.

22. Balla, G., et al., *Hemin: a possible physiological mediator of low density lipoprotein oxidation and endothelial injury.* Arterioscler Thromb, 1991. **11**(6): p. 1700-11.

23. Jeney, V., et al., *Pro-oxidant and cytotoxic effects of circulating heme*. Blood, 2002. **100**(3): p. 879-87.

24. Nagy, E., et al., *Red cells, hemoglobin, heme, iron, and atherogenesis*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2010. **30**(7): p. 1347-53.

25. Belcher, J.D., et al., *Heme triggers TLR4 signaling leading to endothelial cell activation and vaso-occlusion in murine sickle cell disease.* Blood, 2014. **123**(3): p. 377-90.

26. Wagener, F.A., et al., *Heme induces the expression of adhesion molecules ICAM-1, VCAM-1, and E selectin in vascular endothelial cells.* Proc Soc Exp Biol Med, 1997. **216**(3): p. 456-63.

27. Graca-Souza, A.V., et al., *Neutrophil activation by heme: implications for inflammatory processes*. Blood, 2002. **99**(11): p. 4160-5.

28. Porto, B.N., et al., *Heme induces neutrophil migration and reactive oxygen species generation through signaling pathways characteristic of chemotactic receptors.* J Biol Chem, 2007. **282**(33): p. 24430-6.

29. Almeida, C.B., et al., *Acute hemolytic vascular inflammatory processes are prevented by nitric oxide replacement or a single dose of hydroxyurea*. Blood, 2015. **126**(6): p. 711-20.

30. Kubes, P. and W.Z. Mehal, *Sterile inflammation in the liver*. Gastroenterology, 2012. **143**(5): p. 1158-1172.

31. Dutra, F.F., et al., *Hemolysis-induced lethality involves inflammasome activation by heme*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2014. **111**(39): p. E4110-8.

32. Gritsenko, A., et al., *Mechanisms of NLRP3 priming in inflammaging and age related diseases*. Cytokine Growth Factor Rev, 2020. **55**: p. 15-25.

33. Donato, R., *Intracellular and extracellular roles of S100 proteins*. Microsc Res Tech, 2003.60(6): p. 540-51.

34. Ehlermann, P., et al., *Increased proinflammatory endothelial response to S100A8/A9 after preactivation through advanced glycation end products*. Cardiovasc Diabetol, 2006. **5**: p. 6.

35. Vogl, T., et al., *Mrp8 and Mrp14 are endogenous activators of Toll-like receptor 4, promoting lethal, endotoxin-induced shock.* Nat Med, 2007. **13**(9): p. 1042-9.

36. Narumi, K., et al., *Proinflammatory Proteins S100A8/S100A9 Activate NK Cells via Interaction with RAGE*. J Immunol, 2015. **194**(11): p. 5539-48.

37. Simard, J.C., et al., *S100A8 and S100A9 induce cytokine expression and regulate the NLRP3 inflammasome via ROS-dependent activation of NF-kappaB(1.).* PLoS One, 2013. **8**(8): p. e72138.

38. Corr, E.M., et al., *Osteoarthritis-associated basic calcium phosphate crystals activate membrane proximal kinases in human innate immune cells.* Arthritis Res Ther, 2017. **19**(1): p. 23.

39. Corr, E.M., C.C. Cunningham, and A. Dunne, *Cholesterol crystals activate Syk and PI3 kinase in human macrophages and dendritic cells*. Atherosclerosis, 2016. **251**: p. 197-205.

40. Silveira, A.A.A., et al., *S100A8 acts as an autocrine priming signal for heme-induced human Mvarphi pro-inflammatory responses in hemolytic inflammation.* J Leukoc Biol, 2019. **106**(1): p. 35-43.

41. Yu, Q., et al., *Interactions between NLRP3 inflammasome and glycolysis in macrophages: New insights into chronic inflammation pathogenesis.* Immun Inflamm Dis, 2022. **10**(3): p. e581.

42. Renaudin, F., et al., *Gout and pseudo-gout-related crystals promote GLUT1-mediated glycolysis that governs NLRP3 and interleukin-1beta activation on macrophages.* Ann Rheum Dis, 2020. **79**(11): p. 1506-1514.

43. Cairns, R.A., I.S. Harris, and T.W. Mak, *Regulation of cancer cell metabolism*. Nat Rev Cancer, 2011. **11**(2): p. 85-95.

44. Moon, J.S., et al., *mTORC1-Induced HK1-Dependent Glycolysis Regulates NLRP3 Inflammasome Activation*. Cell Rep, 2015. **12**(1): p. 102-115.

45. Saemann, M.D., et al., *The multifunctional role of mTOR in innate immunity: implications for transplant immunity.* Am J Transplant, 2009. **9**(12): p. 2655-61.

46. Buerger, C., et al., *Inflammation dependent mTORC1 signaling interferes with the switch from keratinocyte proliferation to differentiation*. PLoS One, 2017. **12**(7): p. e0180853.

47. Ohata, H., et al., *NOX1-Dependent mTORC1 Activation via S100A9 Oxidation in Cancer Stemlike Cells Leads to Colon Cancer Progression*. Cell Rep, 2019. **28**(5): p. 1282-1295 e8.

48. Peace, C.G. and L.A. O'Neill, *The role of itaconate in host defense and inflammation*. J Clin Invest, 2022. **132**(2).

49. Li, W., et al., *Erythroblastic Island Macrophages Shape Normal Erythropoiesis and Drive Associated Disorders in Erythroid Hematopoietic Diseases.* Front Cell Dev Biol, 2020. **8**: p. 613885.

50. Marcero, J.R., et al., *The immunometabolite itaconate inhibits heme synthesis and remodels cellular metabolism in erythroid precursors.* Blood Adv, 2021. **5**(23): p. 4831-4841.

51. Mily, A., et al., *Polarization of M1 and M2 Human Monocyte-Derived Cells and Analysis with Flow Cytometry upon Mycobacterium tuberculosis Infection.* J Vis Exp, 2020(163).

52. Taylor, C.T. and C.C. Scholz, *The effect of HIF on metabolism and immunity*. Nature Reviews Nephrology, 2022. **18**(9): p. 573-587.

53. Infantino, V., et al., *Cancer Cell Metabolism in Hypoxia: Role of HIF-1 as Key Regulator and Therapeutic Target.* International Journal of Molecular Sciences, 2021. **22**(11): p. 5703.

54. Shen, H.H., et al., *HIF1A-induced heme oxygenase 1 promotes the survival of decidual stromal cells against excess heme-mediated oxidative stress.* Reproduction, 2021. **163**(1): p. 33-43.

55. Jacques, R.R.M., et al., *Investigating the real role of HIF-1 and HIF-2 in iron recycling by macrophages*. Haematologica, 2014. **99**(7): p. e112-e114.

56. Zhou, Y., et al., *Oxidative stress-mediated mitochondrial fission promotes hepatic stellate cell activation via stimulating oxidative phosphorylation*. Cell Death & Disease, 2022. **13**(8): p. 689.

57. Duchen, M.R., *Mitochondria and calcium: from cell signalling to cell death*. J Physiol, 2000.
529 Pt 1(Pt 1): p. 57-68.

58. Nakahira, K., S. Hisata, and A.M. Choi, *The Roles of Mitochondrial Damage-Associated Molecular Patterns in Diseases*. Antioxid Redox Signal, 2015. **23**(17): p. 1329-50.

59. Hao, T., et al., *Hypoxia-reprogramed megamitochondrion contacts and engulfs lysosome to mediate mitochondrial self-digestion*. Nature Communications, 2023. **14**(1): p. 4105.

60. Kapetanovic, R., et al., *Lipopolysaccharide promotes Drp1-dependent mitochondrial fission and associated inflammatory responses in macrophages*. Immunology & Cell Biology, 2020. **98**(7): p. 528-539.

61. Adebayo, M., et al., *Mitochondrial fusion and fission: The fine-tune balance for cellular homeostasis.* Faseb j, 2021. **35**(6): p. e21620.

62. Liu, R. and D.C. Chan, *The mitochondrial fission receptor Mff selectively recruits oligomerized Drp1*. Molecular Biology of the Cell, 2015. **26**(24): p. 4466-4477.

63. Losón, O.C., et al., *Fis1*, *Mff*, *MiD49*, and *MiD51* mediate Drp1 recruitment in mitochondrial fission. Molecular Biology of the Cell, 2013. **24**(5): p. 659-667.

64. Kornfeld, O.S., et al., *Interaction of mitochondrial fission factor with dynamin related protein 1 governs physiological mitochondrial function in vivo*. Scientific Reports, 2018. **8**(1): p. 14034.

65. Suh, J., et al., *Mitochondrial fragmentation and donut formation enhance mitochondrial secretion to promote osteogenesis.* Cell Metabolism, 2023. **35**(2): p. 345-360.e7.

66. Silveira, A.A.A., et al., *S100A8 acts as an autocrine priming signal for heme-induced human Mvarphi pro-inflammatory responses in hemolytic inflammation.* J Leukoc Biol, 2019.

67. Yuan, J.Q., S.M. Wang, and L. Guo, *S100A9 promotes glycolytic activity in HER2-positive breast cancer to induce immunosuppression in the tumour microenvironment*. Heliyon, 2023. **9**(2): p. e13294.

68. Li, Y., et al., *S100A10 Accelerates Aerobic Glycolysis and Malignant Growth by Activating mTOR-Signaling Pathway in Gastric Cancer*. Front Cell Dev Biol, 2020. **8**: p. 559486.

69. Ling, F. and Q. Lu, *S100 calcium-binding protein A10 contributes to malignant traits in osteosarcoma cells by regulating glycolytic metabolism via the AKT/mTOR pathway.* Bioengineered, 2022. **13**(5): p. 12298-12308.

70. Li, C., et al., *S100A2 promotes glycolysis and proliferation via GLUT1 regulation in colorectal cancer*. The FASEB Journal, 2020. **34**(10): p. 13333-13344.

71. Düvel, K., et al., *Activation of a metabolic gene regulatory network downstream of mTOR complex I*. Mol Cell, 2010. **39**(2): p. 171-83.

72. Janciauskiene, S., V. Vijayan, and S. Immenschuh, *TLR4 Signaling by Heme and the Role of Heme-Binding Blood Proteins*. Front Immunol, 2020. **11**: p. 1964.

73. Kastl, L., et al., *TNF-\alpha mediates mitochondrial uncoupling and enhances ROS-dependent cell migration via NF-\kappaB activation in liver cells. FEBS Lett, 2014. 588(1): p. 175-83.* 

74. Akhter, N., et al., *ROS/TNF-α Crosstalk Triggers the Expression of IL-8 and MCP-1 in Human Monocytic THP-1 Cells via the NF-κB and ERK1/2 Mediated Signaling.* Int J Mol Sci, 2021. **22**(19).

75. Blaser, H., et al., *TNF and ROS Crosstalk in Inflammation*. Trends Cell Biol, 2016. **26**(4): p. 249-261.

76. Suematsu, N., et al., *Oxidative stress mediates tumor necrosis factor-alpha-induced mitochondrial DNA damage and dysfunction in cardiac myocytes.* Circulation, 2003. **107**(10): p. 1418-23.

77. Fernandez, P.L., et al., *Heme amplifies the innate immune response to microbial molecules through spleen tyrosine kinase (Syk)-dependent reactive oxygen species generation.* J Biol Chem, 2010. **285**(43): p. 32844-51.

78. Hinchy, E.C., et al., *Mitochondria-derived ROS activate AMP-activated protein kinase (AMPK) indirectly*. J Biol Chem, 2018. **293**(44): p. 17208-17217.

79. Kapetanovic, R., et al., *Lipopolysaccharide promotes Drp1-dependent mitochondrial fission and associated inflammatory responses in macrophages.* Immunol Cell Biol, 2020. **98**(7): p. 528-539.

80. O'Rourke, S.A., et al., *Cholesterol crystals drive metabolic reprogramming and M1 macrophage polarisation in primary human macrophages*. Atherosclerosis, 2022. **352**: p. 35-45.

81. Shanley, L.C., et al., *Macrophage metabolic profile is altered by hydroxyapatite particle size*. Acta Biomater, 2023. **160**: p. 311-321.

82. Sharma, R., et al., *Macrophage metabolic rewiring improves heme-suppressed efferocytosis and tissue damage in sickle cell disease*. Blood, 2023. **141**(25): p. 3091-3108.

83. Lee, W.E., E. Genetzakis, and G.A. Figtree, *Novel Strategies in the Early Detection and Treatment of Endothelial Cell-Specific Mitochondrial Dysfunction in Coronary Artery Disease.* Antioxidants (Basel), 2023. **12**(7).

84. Zhang, B., et al., *Role of mitochondrial reactive oxygen species in homeostasis regulation*. Redox Rep, 2022. **27**(1): p. 45-52. 85. Tan, Q., et al., *Potential roles of IL-1 subfamily members in glycolysis in disease*. Cytokine Growth Factor Rev, 2018. **44**: p. 18-27.

86. Ciesla, J., I. Moreno, Jr., and J. Munger, *TNFα-induced metabolic reprogramming drives an intrinsic anti-viral state*. PLoS Pathog, 2022. **18**(7): p. e1010722.

87. Saravia, J., et al., Signaling networks in immunometabolism. Cell Res, 2020. 30(4): p. 328-342.

88. Zhu, L., et al., *Cellular metabolism and macrophage functional polarization*. Int Rev Immunol, 2015. **34**(1): p. 82-100.

89. Odegaard, J.I. and A. Chawla, *Alternative macrophage activation and metabolism*. Annu Rev Pathol, 2011. **6**: p. 275-97.

90. Rodríguez-Prados, J.C., et al., *Substrate fate in activated macrophages: a comparison between innate, classic, and alternative activation.* J Immunol, 2010. **185**(1): p. 605-14.

91. Soares, M.P. and I. Hamza, *Macrophages and Iron Metabolism*. Immunity, 2016. **44**(3): p. 492-504.

92. Bories, G.F.P., et al., *Macrophage metabolic adaptation to heme detoxification involves Codependent activation of the pentose phosphate pathway.* Blood, 2020. **136**(13): p. 1535-1548.

93. Gozzelino, R., V. Jeney, and M.P. Soares, *Mechanisms of cell protection by heme oxygenase-1*. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 2010. **50**: p. 323-54.

94. Chin, B.Y., et al., *Hypoxia-inducible factor 1alpha stabilization by carbon monoxide results in cytoprotective preconditioning.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(12): p. 5109-14.

95. Semenza, G.L., *Hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) pathway.* Sci STKE, 2007. **2007**(407): p. cm8.

96. Hotamisligil, G.S., *Foundations of Immunometabolism and Implications for Metabolic Health and Disease*. Immunity, 2017. **47**(3): p. 406-420.

97. Vogl, T., et al., *Autoinhibitory regulation of S100A8/S100A9 alarmin activity locally restricts sterile inflammation.* J Clin Invest, 2018. **128**(5): p. 1852-1866.

98. Foell, D., et al., *S100 proteins expressed in phagocytes: a novel group of damage-associated molecular pattern molecules.* J Leukoc Biol, 2007. **81**(1): p. 28-37.

99. Kawai, T. and S. Akira, *Signaling to NF-kappaB by Toll-like receptors*. Trends Mol Med, 2007.13(11): p. 460-9.

100. Dreschers, S., et al., *Impaired cellular energy metabolism in cord blood macrophages contributes to abortive response toward inflammatory threats.* Nat Commun, 2019. **10**(1): p. 1685.

101. Laplante, M. and D.M. Sabatini, *mTOR signaling at a glance*. J Cell Sci, 2009. **122**(Pt 20): p. 3589-94.

102. Freemerman, A.J., et al., *Metabolic reprogramming of macrophages: glucose transporter 1 (GLUT1)-mediated glucose metabolism drives a proinflammatory phenotype*. J Biol Chem, 2014. **289**(11): p. 7884-96.

103. Weichhart, T., M. Hengstschläger, and M. Linke, *Regulation of innate immune cell function by mTOR*. Nat Rev Immunol, 2015. **15**(10): p. 599-614.

104. Hallowell, R.W., et al., *mTORC2 signalling regulates M2 macrophage differentiation in response to helminth infection and adaptive thermogenesis.* Nat Commun, 2017. **8**: p. 14208.

105. Huang, S.C., et al., *Metabolic Reprogramming Mediated by the mTORC2-IRF4 Signaling Axis Is Essential for Macrophage Alternative Activation*. Immunity, 2016. **45**(4): p. 817-830.

106. Ghavami, S., et al., *S100A8/A9 induces autophagy and apoptosis via ROS-mediated cross-talk between mitochondria and lysosomes that involves BNIP3.* Cell Res, 2010. **20**(3): p. 314-31.

107. Norata, G.D., et al., *The Cellular and Molecular Basis of Translational Immunometabolism*. Immunity, 2015. **43**(3): p. 421-34.

108. Real, F., et al., *S100A8-mediated metabolic adaptation controls HIV-1 persistence in macrophages in vivo*. Nat Commun, 2022. **13**(1): p. 5956.

109. Wang, S., et al., *S100A8/A9 in Inflammation*. Front Immunol, 2018. 9: p. 1298.

110. Mager, C.E., et al., *p38 MAPK and MKP-1 control the glycolytic program via the bifunctional glycolysis regulator PFKFB3 during sepsis.* J Biol Chem, 2023. **299**(4): p. 103043.

Wang, F., et al., *p38y MAPK Is Essential for Aerobic Glycolysis and Pancreatic Tumorigenesis*.
Cancer Res, 2020. **80**(16): p. 3251-3264.

112. Liu, J., et al., *p38MAPK Signaling Enhances Glycolysis Through the Up-Regulation of the Glucose Transporter GLUT-4 in Gastric Cancer Cells.* Cell Physiol Biochem, 2015. **36**(1): p. 155-65.

113. Sozen, B., et al., *The p38 MAPK signalling pathway is required for glucose metabolism, lineage specification and embryo survival during mouse preimplantation development.* Mech Dev, 2015. **138 Pt 3**: p. 375-98.

114. Khan, A.U.H., et al., *Human Leukemic Cells performing Oxidative Phosphorylation (OXPHOS) Generate an Antioxidant Response Independently of Reactive Oxygen species (ROS) Production.* EBioMedicine, 2016. **3**: p. 43-53.

115. Xu, Y., et al., *Why All the Fuss about Oxidative Phosphorylation (OXPHOS)?* J Med Chem, 2020. **63**(23): p. 14276-14307.